

AMÉLIORATION DE LA RÉSISTANCE DE LA POMME DE TERRE À LA GALE
COMMUNE PAR L'HABITUATION DE CALS À LA THAXTOMINE A ET LE
TRAITEMENT AU 2,4-D

par

Safa Labidi

Thèse présentée au département de Biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTE DES SCIENCES

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2020

Le 03 janvier 2020

*Le jury a accepté la thèse de Madame Safa Labidi
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeure Nathalie Beaudoin
Directrice de recherche
Département de biologie

Professeure Carole Beaulieu
Codirectrice de recherche
Département de biologie

Professeur Dominique Michaud
Codirecteur de recherche
Département de phytologie, Université Laval

Professeur Richard Hogue
Évaluateur externe
IRDA

Professeur Peter Moffett
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeure Pascale Beauregard
Président-rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

La pomme de terre est une plante d'une importance nutritive et économique très élevée, étant le légume le plus consommé au Canada et occupant le 3^{ème} rang des productions horticoles au Québec. La pomme de terre peut être l'hôte de différents agents pathogènes. L'un des plus destructeurs est la bactérie *Streptomyces scabies* (Thaxter, 1892) qui cause la maladie de la gale commune. Cette bactérie produit une phytotoxine, la thaxtamine A (TA), qui est indispensable pour l'apparition des symptômes. La gale commune ne peut être contrôlée par aucun pesticide homologué et il n'existe aucun cultivar totalement résistant à la maladie, il est donc nécessaire de développer des méthodes de lutte alternatives.

Tenant compte de l'importance et de l'implication de la thaxtamine A dans le développement de la maladie, une méthode a été développée, cette technique consiste à habituer des cals de pomme de terre à la TA dans le but de produire des cultivars plus résistants à la TA et éventuellement à la gale commune. Des cals de différents cultivars de pomme de terre ont été produits et transférés plusieurs fois dans le temps sur un milieu contenant des concentrations de TA de plus en plus élevées. À partir de ces cals, des embryons somatiques ont été régénérés pour obtenir de nouveaux somaclones. Certaines des plantes régénérées ont été testées pour la résistance à la TA et à la gale commune. Il s'est avéré que certains régénérants issus des cultivars Russet Burbank et Yukon Gold habitués à la TA étaient effectivement plus résistants à la gale commune que le cultivar d'origine. Dans le présent projet, j'ai confirmé la stabilité au fil des années de la résistance de deux somaclones, YG8 et YG32, obtenus à la suite de l'habituation de Yukon Gold à la TA. Pour comprendre ces changements au niveau de la résistance, une étude protéomique a été faite. Une augmentation de l'abondance de différentes protéines a été notée. Parmi ces protéines, 42 % étaient impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques et 12,5 % dans les réponses de défense. La protéine dont l'abondance a augmenté 11 et 19 fois respectivement chez YG8 et YG32 est la ferritine, une protéine chélatrice de fer. Vu la relation directe entre le taux de fer et l'abondance de la ferritine chez la pomme de terre, une quantification des métaux a été effectuée. Une augmentation significative du taux du fer, du magnésium et du zinc a été

notée chez les deux somaclones résistants. La chlorophylle a aussi été affectée par le manque de disponibilité du fer chélaté par la ferritine. Ceci a provoqué une diminution significative du taux de la chlorophylle au niveau des feuilles de YG8 et YG32 par rapport au cultivar parent. Au niveau du périderme, les somaclones YG8 et YG32 ont présenté un nombre de couches subérifiées plus élevé par rapport au cultivar parental. La composition de la subérine au niveau du périderme a été modifiée chez les somaclones résistants. Les bactéries cultivées en présence de la subérine extraite du périderme de YG8 et YG32 a produit significativement moins de TA que celle cultivées en présence de subérine du périderme de Yukon Gold parent. L'habitué a été appliquée à de nouveaux cultivars utilisés au Québec ou en cours de développement, et qui possèdent initialement des résistances variables à la TA et à la gale commune. De nouveaux somaclones ont été obtenus à partir du cultivar Shepody. Parmi ces somaclones, certains ont démontré une résistance plus élevée à la gale commune lors des premiers tests. La subérine extraite du périderme des somaclones de Shepody a provoqué le même effet sur la bactérie que celle des somaclones YG8 et YG32. Ces résultats ont démontré que l'habitué des cals à la TA permet de régénérer des somaclones résistants à la gale commune et que cette résistance est accompagnée de changements au niveau du protéome et au niveau du périderme.

Dans la seconde partie de ce projet, l'efficacité d'un traitement à l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) contre la gale commune a été vérifiée. Les résultats ont été confirmés et une étude protéomique a été faite pour identifier les changements menant à l'induction de la résistance. Parmi les protéines devenues plus abondantes après le traitement au 2,4-D, 50 % sont impliquées dans les réponses de défense et 25 % dans les réponses au stress biotique et abiotique. La protéine la plus abondante est la lipoxigénase (Lox) avec 5,49 fois plus chez les tubercules dont les plants ont été traités au 2,4-D comparés aux témoins. L'effet du traitement au niveau du périderme a été évalué. La subérine extraite du périderme des tubercules dont les plants ont été traités au 2,4-D a induit l'inhibition du développement de la bactérie mais aussi sa capacité à produire de la TA. Les résultats de cette 2^{ème} partie du projet supportent nos hypothèses que le traitement au 2,4-D protège la pomme de terre contre la gale commune en induisant des changements au niveau du protéome et au niveau du périderme. Les protéines rendues plus abondantes indiquent que le traitement au 2,4-D a induit plusieurs voies de réponses aux stress et a aussi impliqué un

changement au niveau des barrières physiques du tubercules pour rendre la colonisation plus difficile par l'agent pathogène.

Mots clés : gale commune, thaxtamine A, habituation, variants somaclonaux, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, résistance, périderme.

DÉDICACE

Avec beaucoup de reconnaissance, je dédie cet ouvrage à ma très chère *Dalloulti*, la femme qui a fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

À mes chers parents qui n'ont jamais cessé de croire en moi et de me soutenir.

A mes frères, mes grands-parents et tous les membres de ma famille qui ont partagé avec moi les émotions et les sacrifices tout au long de mon parcours.

Une dédicace spéciale à mon conjoint *Issam*, mon compagnon de tous les jours et de toutes les circonstances merci pour ton amour, ta présence et ta patience sans faille.

À tous mes amis qui m'ont toujours encouragée et soutenue (*Refka, Nidou, Sonia, Salwa, Yosra...*) et que je leur souhaite beaucoup de réussite en retour.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dre Nathalie Beaudoin, pour m'avoir permise de travailler sur ce projet. Merci pour les commentaires et les corrections durant la rédaction de la thèse et pour les encouragements dans les moments de stress.

Je remercie également mes codirecteurs et mes conseillers, Dre Carole Beaulieu, Dr Dominique Michaud, Dr Peter Moffett et Dre Pascale Beauregard pour leur suivi de l'avancement de mon projet et pour leurs commentaires constructifs.

Je tiens à remercier tout le personnel du département de biologie pour tous leurs services, je remercie spécialement Daniel Garneau pour son aide précieuse en microscopie.

J'aimerais remercier également le Centre SÈVE, pour toutes les bourses de participation aux congrès ainsi que pour les formations complémentaires. Je remercie particulièrement Chantal Binda, merci pour l'implication et la réactivité.

Il m'est impossible d'oublier de remercier tous les collègues et tous les stagiaires Jenia, Joel, Ludo, David...qui ont contribué à l'accomplissement de ce projet. Un grand merci spécialement à mon collègue et ami Marc-Antoine pour sa présence dans les moments de stress, son écoute et son aide précieuse.

Un grand merci et beaucoup de reconnaissance à ma chère amie et collègue Refka qui a toujours fait tout son possible pour m'aider et me soutenir.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai partagé ces années de thèse. Mes derniers remerciements vont à mon conjoint Issam et mon oncle Mongi pour avoir révisé ma thèse et pour leurs encouragements.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iv
DÉDICACE.....	vii
REMERCIEMENTS	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	xvi
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	4
1. 1. Préambule	4
1.2. La pomme de terre	4
1.2.1. Production de la pomme de terre	4
1.2.2. Taxonomie et cycle	5
1.2.3. Maladies de la pomme de terre	6
1.3. La gale commune.....	6
1.3.1. Importance de la maladie	6
1.3.2. Symptômes de la maladie.....	7
1.3.3. Agent causal : <i>Streptomyces scabies</i>	8
1.3.4. La thaxtomine A.....	10
1.3.4.1. Description	10
1.3.4.2. Implication de la thaxtomine A dans la maladie de la gale commune	11
1.3.4.3. Effet de la TA sur la plante et sur les cellules végétales	12
1.3.4.4. La TA et le système de défense de la plante.....	13
1.3.5. La résistance et la lutte contre la gale commune.....	14
1.3.5.1 Généralités sur les défenses naturelles de la plante.....	14
1.3.5.2. La résistance de la pomme de terre à la gale commune	14
1.3.5.2.1. Le périoderme et la résistance aux attaques pathogènes	16
1.3.5.2.2. Résistance chimique	18

1.3.5.2.3. Résistance des cultivars	19
1.3.5.2.4. Variation somaclonale	20
1.3.5.3. Autres moyens de lutte contre la gale commune.....	20
1.3.5.3.1. Rotations des cultures	21
1.3.5.3.2. Caractéristiques des sols et les amendements.....	21
1.3.5.3.3. Les traitements chimiques et biologiques.....	22
1.3.5.3.3.1. La fumigation	22
1.3.5.3.3.2. Traitement à l'auxine.....	23
1.4. Résultats antérieurs et hypothèses	23
1.5. Objectifs du projet	25
1.5.1. Objectif 1: Confirmation de la résistance des somaclones YG8 et YG32 à la gale commune et caractérisation.....	26
1.5.2. Objectif 2: Habituation de nouveaux cultivars à la TA et évaluation de leur résistance à la gale commune.	27
1.5.3. Objectif 3 : Analyse des effets du traitement au 2,4-D pour protéger la pomme de terre contre la gale commune	27
CHAPITRE 2.....	28
MATERIEL ET METHODES	28
2.1. Cultivars de pomme de terre	28
2.2. Multiplication et maintien des boutures.....	29
2.3. Extraction et purification de la TA	29
2.4. Production des cals de pomme de terre	30
2.5. Habituation des cals	30
2.6. Régénération d'embryons somatiques de pomme de terre	31
2.7. Évaluation de la résistance à la gale commune.....	31
2.7.1. Production de mycélium de <i>Streptomyces scabies</i>	31
2.7.2. Test d'infection à la gale commune en pots (en chambre de croissance ou en serre).....	32
2.7.3. Infection par bourgeons foliaires	32
2.7.4. Évaluation des tubercules et de la sévérité des symptômes de la gale commune	33

2.8. Effet du 2,4-D dans la résistance à la gale commune	33
2.8.1. Traitement au 2,4-D en chambre de croissance	33
2.8.2. Test de résistance à la TA	34
2.9. Analyse protéomique	34
2.10. Méthodes sans marquage ou « label free »	35
2.11. Extraction d'ARN et PCR quantitative	36
2.12. Quantification des métaux par ICP-MS	37
2.13. Mesure de la chlorophylle.....	38
2.14. Évaluation des changements au niveau du périoderme	38
2.14.1. Évaluation de l'épaisseur des couches cellulaires et de l'agencement des cellules.....	38
2.14.2. Évaluation des changements de la composition du périoderme en subérine	39
2.15. Analyses statistiques	40
CHAPITRE 3.....	41
RÉSULTATS	41
3.1. Confirmation de la résistance des somaclones de Yukon Gold habitués à la TA et caractérisation	41
3.1.1. Évaluation de la résistance des somaclones de Yukon Gold habitués à la TA.....	41
3.1.2. Caractérisation des somaclones YG8 et YG32	46
3.1.2.1. Analyses protéomiques.....	46
3.1.2.2. Quantification des métaux chez Yukon Gold et les somaclones YG8 et YG32	53
3.1.2.3. Quantification de la chlorophylle au niveau des feuilles de Yukon Gold et chez les somaclones YG8 et YG32	54
3.1.2.4. Changement au niveau du périoderme des Yukon Gold.....	55
3.2. Habituation d'autres cultivars de pomme de terre à la TA	58
3.2.1. Régénération de somaclones à partir des cals habituées à la TA.....	58
3.2.2. Évaluation de la résistance des somaclones de Shepody habitués à la TA	59
3.2.2.1. Infection par bourgeons foliaires	59
3.2.2.2. Expériences en chambre de croissance.....	61
3.3. Objectif 3 : Évaluation de l'effet du traitement foliaire au 2,4-D.....	64

3.3.1. Effet du 2,4-D sur la gale commune	64
3.3.2. Test de résistance à la TA des tubercules du cultivar Russet Burbank traités et non traités au 2,4-D.	66
3.3.3. Analyse protéomique des tubercules du cultivar Russet Burbank traités et non traités au 2,4-D.	67
3.3.4. Changements au niveau du périderme	69
CHAPITRE 4.....	73
Discussion générale et conclusions	73
4.1. Objectif 1: Confirmation et caractérisation de la résistance des somaclones de Yukon Gold habitués à la TA	73
4.1.1. Confirmation de la résistance des somaclones YG8 et YG32	73
4.1.2. Caractérisation des somaclones YG8 et YG32	74
4.1.2.1. Analyse protéomique.....	74
4.1.2.2. Quantification des métaux et teneur en chlorophylle	77
4.1.2.3. Changement au niveau du périderme	80
4.2. Objectif 2: Habituation d'autres cultivars à la TA et évaluation de leur résistance à la gale commune	82
4.3. Objectif 3: Évaluation de l'effet du traitement foliaire au 2,4-D.....	85
4.3.1. Induction de la résistance à la gale commune et à la TA	85
4.3.2. Analyse protéomique	86
4.3.3. Changements au niveau du périderme	88
4.4. Conclusion générale.....	89
Annexes	92
Bibliographie	101

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BA	Benzyladenine
CaCO ₃	Carbonate de calcium
CESA	Cellulose synthase
CSC	Complexes de synthèse de la cellulose
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DFO	Déféroxamine
Fe	Fer
GA ₃	Acide Gibbérellique
GC	Gale commune
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IAA	« Indole-3-Acetic-Acid »
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
ISSR	« <i>Inter Sequence Simple Repeat</i> »
IXB	Isoxabène

JA	Acide jasmonique
K ₂ HPO ₄	Hydrogénophosphate de potassium
LFQ	« Label Free Quantification »
Lox	Lipoxygénase
MeOH	Méthanol
Mg	Magnesium
Mn	Manganèse
MS	Milieu nutritif de Murashige et Skoog
NAA	Acide 1-Naphthalène acétique
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
O ²⁻	Superoxide
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
qpcr	PCR quantitative en temps réel
RAPD	« <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> »
RB	Cultivar de pomme de terre Russet Burbank
RC DC	Reducing agent and detergent compatible
RH	Réponse hypersensible
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT	Reverse transcriptase
SA	Acide salicylique

SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
TA	Thaxtamine A
TCTP	Protéines tumorales régulées par la traduction
Tris-HCl	2-Amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol hydrochloride
YG32	Somaclone 32 du cultivar Yukon Gold
YG8	Somaclone 8 du cultivar Yukon Gold
YGP	Cultivar de pomme de terre Yukon Gold
Zea	Zéatine
Zn	Zinc

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Les cultivars de pomme de terre utilisés dans le projet (ACIA, 2013).....	28
Tableau 2.	Amorces utilisées pour les tests de qPCR au cours du projet.....	37
Tableau 3.	Évaluation des symptômes de la gale commune chez les tubercules des différents somaclones de Yukon Gold après une infection par <i>S. scabies</i> en pots, été 2014.....	42
Tableau 4.	Pourcentage de tubercules vendables chez les somaclones YG8 et YG32 et le cultivar parental (YGP) après infection par <i>S. scabies</i> pour les tests réalisés pour les années de 2014 à 2017.....	44
Tableau 5.	Protéines dont l'abondance est augmentée d'un facteur ≥ 2 à la fois chez les somaclones YG8 et YG32 par rapport au cultivar parent (YGP).	47
Tableau 6.	Protéines dont l'abondance est réduite d'un facteur ≥ 2 en commun dans les lignées YG8 et YG32 par rapport à la lignée parent YG (YGP).....	51
Tableau 7.	Nombre de couches subérifiées du périoderme des tubercules de YGP, YG8 et YG32.....	57
Tableau 8.	Production de TA par <i>S. scabies</i> en présence de subérine extraite des tubercules des somaclones YG8 et YG32 et du cultivar original YGP.....	57
Tableau 9.	Régénérants obtenus à partir de cals de différents cultivars habitués à la TA.....	59
Tableau 10.	Nombre de tubercules récoltés et pourcentage de tubercules vendables chez les somaclones et le cultivar parent de Shepody.....	61

Tableau 11.	Nombre de tubercules récoltés et pourcentage de tubercules vendables chez les somaclones et le cultivar parent de Shepody.....	63
Tableau 12.	Protéines dont l'abondance est augmentée d'un facteur ≥ 2 chez les tubercules de Russet Burbank traitées au 2,4-D comparées aux non traitées.....	68
Tableau 13.	Évaluation du nombre et de la forme des couches subérifiées au niveau du périderme de la partie basale des tubercules de RB témoin et RB traité au 2,4 D.....	71
Tableau 14.	Croissance de <i>S. scabies</i> et sa production de TA en présence de subérine extraite des tubercules de Russet Burbank témoins et traités au 2,4-D.....	72
Tableau S.1	Protéines dont l'abondance est augmentée ou diminuée d'un facteur ≥ 2 chez les tubercules du somaclone Yukon Gold 8 comparées au cultivar parent YGP.	92
Tableau S.2	Protéines dont l'abondance est augmentée ou diminuée d'un facteur ≥ 2 chez les tubercules du somaclone Yukon Gold 8 comparées au cultivar parent YGP.....	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Représentation d'un plant de pomme de terre en floraison et en tubérisation.....	5
Figure 2.	Tubercules de pomme de terre avec lésions de la gale commune causée par <i>Streptomyces scabies</i>	8
Figure 3.	Cycle vital de la maladie de la gale commune chez la pomme de terre induite par l'agent causal <i>Streptomyces scabies</i>	10
Figure 4.	Structure de la thaxtomine A.....	11
Figure 5.	Diagramme d'une coupe longitudinale d'un tubercule de pomme de terre qui montre la structure du périoderme et d'une lenticelle.....	17
Figure 6.	Évaluation de la résistance à la gale commune chez les somaclones YG8 et YG32 comparés au cultivar d'origine YGP suite à des infections par <i>S. scabies</i> dans les années 2015, 2016 et 2017.....	43
Figure 7.	Comparaison entre le rendement de YG parent et les deux somaclones YG8 et YG32 pour les années 2015, 2016 et 2017.....	45
Figure 8.	Classification fonctionnelle des protéines dont l'abondance est augmentée chez les deux somaclones YG8 et YG32 par rapport au cultivar parent.....	50
Figure 9.	Expression relative des gènes de la ferritine (A) et de la « P23 tumor protein-like » (B) par rapport au parent et au gène de référence 18S, amplifiés par qPCR à partir de l'ARN extrait des tubercules de YG8 et YG32 somaclones par rapport à YGP.....	52
Figure 10.	Quantification par ICP / MS du fer (A), du magnésium (B), du zinc (C) et du manganèse (D) dans neuf tubercules de YGP, YG8 et YG32 (moyenne de trois tests).....	54

Figure 11.	Mesure de l'indice moyen de la chlorophylle dans les feuilles de YGP, YG8 et YG32 avec un chlorophylle-mètre SPAD-502 (Minolta).....	55
Figure 12.	Visualisation de l'autofluorescence de la subérine au niveau du périclème des tubercules de YGP et les somaclones YG8 et YG32 habitués au TA en utilisant la microscopie à fluorescence.....	56
Figure 13.	Évaluation de la résistance de somaclones de Shepody à la gale commune suite à une infection par <i>S. scabies</i>	60
Figure 14.	Évaluation de la résistance des somaclones Shepody 20 et 24 à la gale commune suite à une infection en pots par <i>S. scabies</i>	62
Figure 15.	Poids moyen des tubercules récoltés des somaclones habitués à la TA et du cultivar parental Shepody.....	64
Figure 16.	Évaluation de l'effet du traitement au 2,4-D sur la résistance à la gale commune chez Russet Burbank infectés par <i>S. scabies</i>	65
Figure 17.	Poids moyens des tubercules de Russet Burbank récoltés suite aux différents traitements (témoins, témoins traités, infectés et infectés traités).....	66
Figure 18.	Photos de tranches de tubercules de Russet Burbank après trois jours de différents traitements (A : témoins ; B : témoins traités au 2,4-D ; C : témoins + 5 μ M de TA ; D : témoins traités au 2,4-D + 5 μ M de TA).....	67
Figure 19.	Expression relative des gènes de la lipoxigénase (A) et de « 'Glutathione S-transférase L3-like' (B) chez RB traités par rapport à RB témoin et par rapport au gène de référence 18S amplifiés par qPCR à partir de l'ARN extrait des tubercules de RB et RB traités au 2,4-D, trois répliques biologiques.....	69
Figure 20.	Visualisation de l'autofluorescence de la subérine au niveau du périclème des tubercules de RB et RB traités au 2,4-D.....	70

Figure S.1.	Quantification du phosphore (A), du cuivre (B) et du potassium(C) par ICP / MS dans neuf tubercules de chaque somaclone YG8 et YG32 ainsi que le cultivar parent YGP.....	100
-------------	---	-----

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. 1. Préambule

La gale commune est une maladie qui affecte la qualité esthétique de la pomme de terre sans affecter sa qualité nutritionnelle. L'agent causal de cette maladie est une bactérie nommée *Streptomyces scabies*. La gale commune a un impact majeur sur la culture de la pomme de terre au Québec. Actuellement, il n'existe aucune méthode de lutte efficace contre cette maladie qui provoque, ainsi, chaque année, d'importantes pertes économiques. Ce projet vise à approfondir nos connaissances des mécanismes qui régissent la gale commune de la pomme de terre et à développer une méthode qui pourrait réduire l'incidence de la maladie et la sévérité des symptômes.

1.2. La pomme de terre

1.2.1. Production de la pomme de terre

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est la quatrième plus importante culture vivrière dans le monde, après celles du blé, du maïs et du riz. Le Canada se classe au 12^e rang des plus grands producteurs de pommes de terre, avec 4,77 millions de tonnes par année, et cinquième exportateur mondial de semences de pomme de terre (AAC, 2017). Par exemple, en 2014, les exportations de pommes de terre et de produits dérivés ont été estimées à 1,29 milliard de dollars (Statcan, 2015). De plus, la production de pommes de terre au Canada en 2015 a été estimée à 4,8 millions de tonnes métriques, en hausse de 4,1 % par rapport à 2014. Le Manitoba est à l'origine de 57,2 % de cette croissance, alors que le Québec en représente 29,1 %. La superficie récoltée a aussi légèrement augmenté de 0,4 % par rapport à 2014. L'Île-du-Prince-Édouard représente 23,7 % de la production totale de pommes de terre et le Manitoba, 20,6 % pour l'année 2015 (Statcan, 2015).

1.2.2. Taxonomie et cycle vital

La pomme de terre est une plante herbacée qui appartient à la famille des Solanacées. Cette famille regroupe quelques 2000 espèces dont la tomate (*S. lycopersicum* L.), le poivron (*Capsicum annuum* L.), le tabac (*Nicotiana tabacum* L.) et l'aubergine (*S. melongena* L. var. *esculentum*) (Spooner et Knapp, 2013). Les formes cultivées de *S. tuberosum* sont autotétraploïdes et très hétérogènes ($2n = 4x = 48$). Certaines races de *Solanum*. spp. cultivées principalement en Amérique du Sud sont diploïdes ($2n = 2x = 24$), triploïdes ($3x = 36$) ou pentaploïdes ($5x = 60$) (Andersson et Vicente, 2010). L'espèce *S. tuberosum* est divisée en deux sous-espèces : *tuberosum* et *andigena*. La sous-espèce *tuberosum*, ou pomme de terre cultivée à grande échelle en Amérique du Nord et en Europe (Hawkes, 1990). La pomme de terre produit des fleurs et des fruits (Figure 1). La particularité de l'espèce *S. tuberosum* est la production des tubercules qui est la partie comestible de la plante (FAO, 2008).

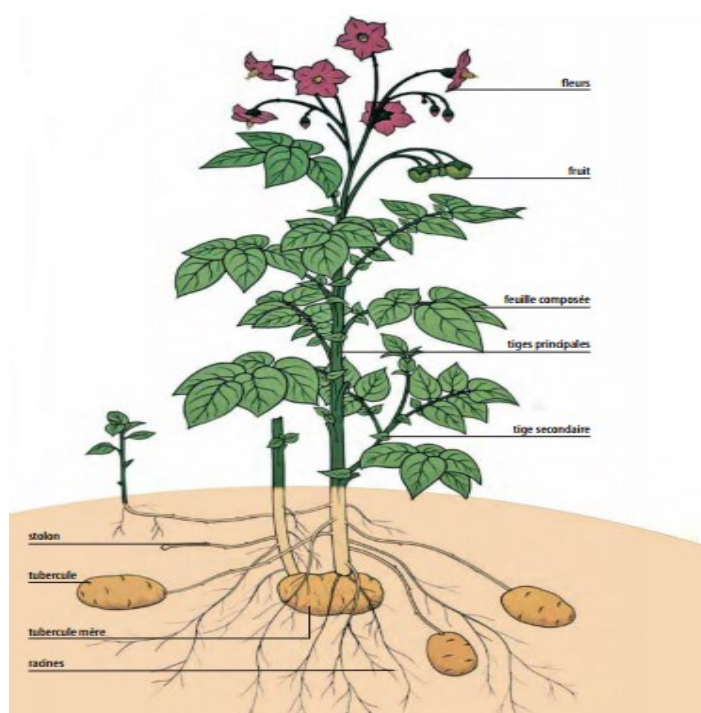


Figure 1. Représentation d'un plant de pomme de terre en floraison et en tubérisation (FAO, 2008).

1.2.3. Maladies de la pomme de terre

Plusieurs agents pathogènes peuvent nuire à la culture de la pomme de terre. Ces pathologies diminuent le rendement d'une part, mais aussi la qualité marchande et la valeur du produit. Plus d'une vingtaine de maladies peuvent affecter la culture de la pomme de terre au Québec. Des maladies fongiques telles que l'alternariose (*Alternaria solani*) et le flétrissement vasculaire (*Fusarium spp.*), affectent principalement le feuillage et les tiges. De plus les pathologies qui causent le plus de dégâts au niveau du tubercule, en le déformant et en réduisant sa valeur, incluent la rhizoctonie (*Rhizoctonia solani*), la gale poudreuse (*Spongospora subterranea*) dans le groupe des maladies fongiques et la gale commune (*S. scabies*) dans le groupe des maladies bactériennes (Jean and Institut de recherche et de développement en agroenvironnement, 2002).

1.3. La gale commune

La gale commune est causée par des actinobactéries qui vivent dans le sol. *S. scabies* étant l'agent causal principal de cette maladie en Amérique du Nord (Wanner, 2009). *S. scabies* infecte le tubercule de la pomme de terre durant le stade de tubérisation, ce qui entraîne des pertes économiques importantes (Hill et Lazarovits, 2005). La gale commune est une maladie qui affecte la qualité esthétique de la pomme de terre sans affecter sa qualité nutritionnelle (Dees et Wanner, 2012). Elle ne réduit ni le rendement, ni la durée de l'entreposage mais affecte la commercialisation des tubercules.

1.3.1. Importance de la maladie

La gale commune cause d'importantes pertes économiques dans toutes les régions productrices de pomme de terre à travers le monde. Elle est classée quatrième parmi les maladies les plus importantes de la pomme de terre en Amérique du Nord (Kinkel *et al.*, 1998). La pomme de terre représente l'hôte le plus affecté par *S. scabies*, mais cette bactérie peut freiner la croissance et causer la nécrose des racines de plusieurs plantes dicotylédones et monocotylédones (Lerat *et al.*, 2009a). Cette maladie affecte également d'autres végétaux dont les parties comestibles se trouvent dans le sol et qui ont une importance économique

élevée tels que la carotte (*Daucus carota* L.), la betterave (*Beta vulgaris* L.), le radis (*Raphanus sativus* L.), la patate douce (*Ipomoea batatas* L.) et l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) (Johnson *et al.*, 2007). La gale commune a été identifiée par les producteurs au Québec comme le problème majeur dans la production de pomme de terre avec une fréquence estimée, en 2002, à environ 80 % des sites de production et des pertes moyennes d'environ 100 \$ par hectare (Hill et Lazarovits, 2005). L'incidence de la maladie a continué de croître depuis les cinq ou dix dernières années malgré les nombreux efforts qui ont été mis en place pour mieux comprendre sa biologie et pour la contrôler. Le comité « pomme de terre » du CRAAQ a d'ailleurs identifié la lutte contre la gale commune parmi ses priorités de recherches. Actuellement un seul pesticide, la chloropicrine semble être efficace contre la gale. Toutefois, son usage à fortes concentrations est, non seulement coûteux, mais aussi, nocif pour l'environnement et toxique pour l'être humain. Ainsi les stratégies de lutttes culturales et variétales représentent le meilleur choix actuel pour réduire l'incidence de cette maladie (Boulet, 2007).

1.3.2. Symptômes de la maladie

Les premiers symptômes de la gale commune se caractérisent par des lésions nécrotiques sur les jeunes tubercules. Ces lésions se forment généralement autour des lenticelles. Dans un état plus avancé, les lésions s'élargissent et brunissent pour former des régions galeuses typiques de la maladie (Figure 2). Les lésions peuvent être plus ou moins profondes selon la sévérité de la maladie, certaines lésions pouvant atteindre 7 mm de profondeur (Dees et Wanner, 2012). Au fur et à mesure que le tubercule croît, les lésions s'élargissent. Plusieurs types de lésions peuvent apparaître, des lésions de surface ou celles qui forment des bosses à texture liégeuse. Dans le cas d'une sévérité élevée, des lésions peuvent former des cavités.

Les symptômes de la maladie sont toujours visibles sur les parties souterraines de la plante qui sont en cours de croissance et en aucun cas sur les parties aériennes de la plante (Agrios, 2005).



Figure 2. Tubercules de pomme de terre avec lésions de la gale commune causée par *Streptomyces scabies* (Bignell *et al.*, 2010).

1.3.3. Agent causal : *Streptomyces scabies*

Le genre *Streptomyces* comporte environ 900 espèces, bien que seulement 12 d'entre elles soient pathogènes pour les plantes. Néanmoins, ces espèces ont eu un impact significatif sur les économies agricoles à travers le monde en raison de leur capacité à provoquer des maladies chez des cultures importantes telles que la pomme de terre, le radis, le navet et la betterave (Bignell *et al.*, 2010b). La majorité des streptomycètes sont des saprophytes capables de dégrader la matière organique, spécialement les biopolymères tels que la lignocellulose, la chitine et l'amidon (Beaulieu *et al.*, 2008). Ces bactéries peuvent produire une grande variété d'enzymes extracellulaires et d'antibiotiques, et possèdent la capacité de coloniser différents environnements (Doubou *et al.*, 2001). Les streptomycètes peuvent synthétiser une variété d'enzymes hydrolytiques tels que les cellulases, les ligninases, les xylanases et les chitinases, leur permettant de dégrader les polymères complexes du sol. Les streptomycètes ont donc accès à plus de nutriments dans le sol (Lauzier, 2007).

S. scabies est une bactérie filamenteuse du sol (Goyer *et al.*, 2009), décrite pour la première fois par Thaxter en 1890, et une nouvelle description de l'espèce a été donnée par Lambert et Loria, (1989). Cette bactérie est le principal agent causal de la gale commune de la pomme de terre en Amérique du Nord. *S. scabies* produit une toxine, la thaxtamine A (TA) qui est

indispensable pour l'apparition des symptômes de la gale commune. Il existe aussi *Streptomyces acidiscabies* et *Streptomyces turgidiscabies* qui sont deux autres espèces induisant cette maladie (Loria *et al.*, 2008). Ces actinobactéries possèdent un génome riche en G et C et sont caractérisées par la production d'hyphes aériens et de chaînes de spores grises en filaments spiralés (Johnson *et al.*, 2007). *S. scabies* passe l'hiver dans le sol. Au printemps les bactéries développent des hyphes à partir du mycélium végétatif. Ces hyphes se transforment en chaînes de spores. Les spores se détachent et se dispersent par le vent, l'érosion du sol ou par les machines agricoles (Wharton *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2015). Pendant l'été, en période de tubérisation, les spores germent sur les tubercules et les hyphes pénètrent le périderme (Figure 3). Pour se nourrir, la bactérie introduit son mycélium jusqu'à 3 couches cellulaires du périderme (Wharton *et al.*, 2007; Tegg *et al.*, 2008).

Les spores produites par *S. scabies* peuvent survivre plusieurs années dans le sol ce qui favorise leur propagation et persistance, colonisant ainsi une grande portion de la biomasse microbienne du sol (Basil *et al.*, 2004; Davelos *et al.*, 2004). Ceci facilite le transport de la bactérie d'un champ infecté à un champ sain, étant donné que le mode de propagation de la pomme de terre est principalement végétatif (Loria *et al.*, 2008). La présence des spores de *S. scabies* dans les tissus végétaux en décomposition dans le sol et les spores produits par les végétaux hôtes secondaires contribuent à la dispersion des spores dans le sol pendant les années ultérieures à la culture de la pomme de terre. Les semences infectées présentant peu de symptômes contribuent également à la dispersion des spores dans d'autres sols. Pour que l'infection se produise, plusieurs processus sont nécessaires. En premier lieu, l'agent pathogène doit détecter la présence d'un hôte. Ensuite, il doit pénétrer et coloniser les tissus de la plante et pouvoir survivre malgré les mécanismes de défense de celle-ci (Bignell *et al.*, 2010b). *S. scabies* pénètre dans les tissus à travers les lenticelles, parfois par les blessures ou directement dans les jeunes tubercules immatures, causant ainsi les symptômes de gale commune. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'intensité de l'infection telle que les conditions environnementales où un sol sec et chaud de 10 à 31°C ainsi qu'un pH supérieur à 5,2 favorisent la survie de la bactérie. Le moment de l'infection est aussi crucial car les infections qui surgissent au début du cycle sont généralement plus sévères. Un autre facteur important, est le pouvoir pathogène des bactéries et les degrés de résistance des cultivars hôtes (Wharton *et al.*, 2007).

produisant pas la toxine (Bender *et al.*, 1999). Pour la maladie de la gale commune, la toxine principale produite par *S. scabies* est la TA. Les thaxtomines sont des dipeptides cycliques dérivés de la phenylalanine et de la tryptophane portant un groupement 4-nitroindole qui est essentiel pour la phytotoxicité (Zhang *et al.*, 2015). Ces toxines sont sécrétées par les bactéries *S. scabies* dans les conditions favorables (King *et al.*, 1989). Il existe onze analogues de thaxtomines produites par *S. scabies*, qui diffèrent par la présence de résidus de méthyle et d'hydroxyle spécifiques et qui déterminent le degré de virulence (King *et al.*, 2003). La TA de formule $C_{22}H_{22}N_4O_6$ (Figure 4) est la forme la plus abondante secrétée par *S. scabies*, *S. turgidiscabies* et *S. acidiscabies* (Goyer *et al.*, 2009). Elle a été isolée pour la première fois par l'équipe de King en 1989 à partir des lésions sur tissus de pommes de terre infectées par *S. scabies* (King *et al.*, 1989).

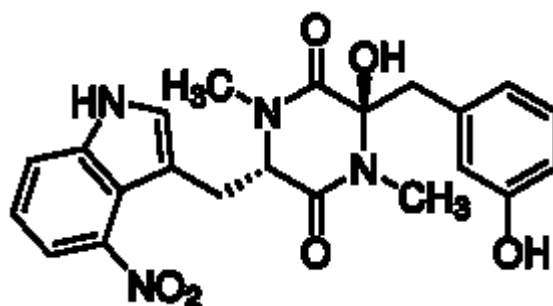


Figure 4. Structure de la thaxtomine A (Scheible *et al.*, 2003).

1.3.4.2. Implication de la thaxtomine A dans la maladie de la gale commune

La TA est la forme majeure de toxine produite par *S. scabies* et elle est indispensable pour la pathogénicité de la bactérie et le développement des symptômes (Bignell *et al.*, 2010b; King *et al.*, 1991). En effet, la pathogénicité de *S. scabies* semble être en corrélation avec la production de TA (Lawrence *et al.*, 1990 ; Tegg *et al.*, 2005). Dans ce sens, il a été observé que les mutants de *S. scabies* déficients en production de TA perdent leur pouvoir pathogène (Healy *et al.*, 2000) alors que l'application de la toxine purifiée sur tubercules induit l'apparition des lésions de la gale commune (Lawrence *et al.*, 1990). La TA est aussi impliquée dans l'activation des mécanismes de défense de la plante. Il a été démontré que l'application de la thaxtomine A ou l'infection par des spores de *S. scabies* sur les feuilles

de tabac ou des plantules d'*Arabidopsis thaliana*, induisent la production de la scopolétine, une phytoalexine avec des propriétés antimicrobiennes. Par contre, en absence de TA ou avec des mutants de *S. scabies* qui ne produisent pas de TA il n'y a pas de production de scopolétine (Lerat *et al.*, 2009b).

1.3.4.3. Effet de la TA sur la plante et sur les cellules végétales

La TA induit une variété de changements phénotypiques chez la plante hôte telle que l'hypertrophie des cellules, et le rabougrissement des racines et des pousses (Fry et Loria, 2002). Il a été démontré que la TA induit une hypertrophie chez les cellules de tabac, les cellules de peuplier hybride en suspensions et les cellules d'*A. thaliana* traitées avec 1 μ M de TA pendant 24 h comparées à des cellules témoins. Les mêmes résultats ont été obtenus par l'ajout d'isoxabène ou de dichlobénile, des inhibiteurs connus de la synthèse de la cellulose (Duval *et al.*, 2005). L'application d'une quantité de 20-200 nM de TA dans des cellules d'*Arabidopsis* en suspensions est suffisante pour induire une forme de mort cellulaire programmée (Duval *et al.*, 2005). La TA inhibe la synthèse de cellulose ou sa déposition étant donné que la TA inhibe l'incorporation de l'isotope C^{14} dans la fraction cellulosique de la paroi (Scheible *et al.*, 2003). La cellulose est un homopolymère linéaire de résidus de glucose liés en β (1-4). La synthèse de la cellulose est médiée par différentes unités de cellulose synthases (CeSA) assemblées dans des complexes multiprotéiques appelés complexes de synthèse de la cellulose (CSC), qui peuvent être vus comme une structure en rosette dans la membrane plasmique (Tateno *et al.*, 2016). Il est suggéré que la TA diminue la stabilité des cellulose synthases au niveau de la membrane plasmique ce qui inhibe l'assimilation du carbone en cellulose (Bischoff *et al.*, 2009; Scheible *et al.*, 2003). L'inhibition de la synthèse de la cellulose est supposée affaiblir la paroi cellulaire et donc faciliter la pénétration de *S. scabies* (Loria *et al.*, 2003). Par contre, il est possible que la TA ait différents modes d'action ou des effets additionnels par rapport aux autres inhibiteurs de synthèse de cellulose. Par exemple, une application de la TA après l'émergence des plantes provoque un sévère flétrissement chez certaines espèces, ce qui n'est pas le cas avec l'isoxabène et le dichlobénile (King *et al.*, 2001). De plus, si on infiltre la TA purifiée dans les feuilles de tabac, ceci induit une mort cellulaire alors que l'infiltration de la même

quantité de dichlobénile n'a pas d'effet sur les feuilles (Tegg *et al.*, 2005 ; Beaulieu *et al.*, 2008).

1.3.4.4. La TA et le système de défense de la plante

La TA provoque chez la plante hôte l'activation de certaines réactions de défense. Les premiers événements qui suivent l'infection et l'incorporation de la TA dans le système de la plante sont les changements au niveau des flux ioniques à travers la membrane plasmique. L'induction de ces flux est plus observée chez les jeunes racines en cours de développement. Il a déjà été démontré que l'ajout de la TA à des racines d'*Arabidopsis* et de tomate induisait rapidement un changement significatif d'influx de Ca^{2+} suivi par un changement de l'efflux de H^+ , ceci précédant l'inhibition de l'expansion des racines (Tegg *et al.*, 2005).

Des recherches antérieures ont aussi montré que la mort cellulaire programmée déclenchée par la TA nécessite l'expression de certains gènes (des gènes codant pour des fonctions reliées à la paroi cellulaire, des protéines de liaison de calcium, des facteurs de transcriptions reliés au stress et au système de défense, des composés de signalisation et des protéines reliées à la mort cellulaire) ainsi que la synthèse de novo de protéines, le tout associé à une fragmentation moléculaire de l'ADN (Duval *et al.*, 2005). En fait, plus de 75 % des gènes qui sont surexprimés en réponse à la TA dans des suspensions d'*Arabidopsis* le sont aussi par l'isoxabène (Duval et Beaudoin, 2009). La comparaison avec d'autres études a révélé que la surexpression de la moitié de ces mêmes gènes est induite par l'effet de l'ozone, des blessures, des éliciteurs bactériens, de la chitine et du H_2O_2 (Duval et Beaudoin, 2009). Par contre, l'expression des gènes typiquement induits pendant une réponse de défense accompagnée par la signalisation classique des voies de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique ou de l'éthylène n'est pas augmentée en réponse à la TA et à l'isoxabène (IXB) (Duval et Beaudoin, 2009). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la synthèse de cellulose induit une mort cellulaire programmée par l'activation des voies communes liées aux stress, qui pourraient d'une certaine manière court-circuiter les voies de défense hormono-dépendantes classiques (Duval et Beaudoin, 2009). Le traitement à la TA modifie l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la cellulose ainsi que des gènes associés au métabolisme de la pectine et de la reconstruction de la paroi cellulaire d'une manière

presque identique à celle de l'IXB (Bischoff *et al.*, 2009). La TA conduit aussi à un dépôt de callose (Bischoff *et al.*, 2009), c'est donc un composé important dans le déclenchement de la défense de la plante (Beaulieu *et al.*, 2008).

1.3.5. La résistance et la lutte contre la gale commune

Comme pour la majorité des maladies de plantes, l'efficacité d'une stratégie de lutte contre la gale commune repose sur l'intégration de plusieurs approches. L'utilisation de cultivars de pomme de terre résistants à la gale commune est l'étape primordiale et fondamentale de la stratégie de lutte. Des cultivars résistants peuvent être obtenus par sélection naturelle parmi les cultivars disponibles, par habitude ou par modification génétique. Cependant, il est toujours nécessaire de suivre les bonnes pratiques culturales et de traiter biologiquement ou chimiquement au besoin pour réussir cette stratégie de lutte.

1.3.5.1 Généralités sur les défenses naturelles de la plante

Les plantes possèdent plusieurs lignes de défense structurales (mécaniques) et chimiques contre la plupart des agents pathogènes. Les barrières de protection mécaniques telles que la cuticule et la paroi pecto-cellulosique confèrent à la plante une résistance constitutive qui représente le premier niveau de défense de la plante. Par exemple, dans le cas de la gale commune, la première barrière est le périderme. Cette résistance est peu spécifique mais permet de limiter la propagation de nombreux pathogènes par des renforcements pariétaux. Ensuite et une fois ces barrières traversées un système de surveillance détecte les corps étrangers et déclenche une réponse rapide (Nasraoui, 2006). Cette ligne de défense est activée ou induite par les PAMPs (*pathogens associated molecular patterns*). Les PAMPs peuvent être, des peptides, des composants de la paroi cellulaire, des enzymes ou des toxines pour supprimer la défense des plantes (Kushalappa *et al.*, 2016). Les éliciteurs ou PAMPs sont reconnus par les récepteurs de reconnaissance de la plante (PRR) qui sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et transportés vers la membrane plasmique (Frescatada-Rosa *et al.*, 2015). Cette reconnaissance déclenche une réponse rapide appelée immunité déclenchée ou induite par les PAMP /pattern (PTI, PAMPs triggered immunity) (Nejat et Mantri, 2017) . Il s'agit d'une réponse de défense générale et non spécifique qui offre une

résistance basale contre une grande variété d'agents pathogènes (Kushalappa *et al.*, 2016). Pour que la plante soit résistante à un agent pathogène spécifique, les deux protagonistes doivent posséder des gènes complémentaires : un gène de résistance R pour la plante et un gène d'avirulence Avr pour l'agent pathogène. Les agents pathogènes spécialisés produisent des éliciteurs intracellulaires spécifiques appelés effecteurs, produits par des gènes d'avirulence (AVR) (Oliver and Solomon, 2010). L'interaction entre les produits (ou leurs dérivés) de ces deux gènes (R et Avr) conduit à une résistance spécifique, la ETI (Effector triggered immunity). La ETI est hautement spécifique à l'espèce et se traduit par une résistance beaucoup plus forte et plus durable que la PTI et peut, en général, empêcher la propagation du pathogène (Spoel et Dong, 2012). L'induction de la ETI s'accompagne souvent d'une mort cellulaire localisée au site d'entrée du pathogène se traduisant par une réaction hypersensible (RH) caractérisée par une lésion nécrotique des cellules végétales aux sites agressés (Lo Presti *et al.*, 2015). Ce phénomène de réponse hypersensible (RH), est l'une des premières manifestations visibles des réponses de défense induites et ressemble à la mort cellulaire programmée (PCD) chez les animaux (Lim *et al.*, 2017). PTI et ETI partagent de nombreux composants de signalisation, et les deux voies impliquent la signalisation via une ou plusieurs phytohormones. Parmi ceux-ci, l'acide salicylique (SA) et l'acide jasmonique (JA) sont bien connus pour réguler la défense des plantes (Kachroo et Kachroo, 2009). L'acide salicylique est un petit composé phénolique synthétisé par la voie de shikimate. L'acide jasmonique est dérivé de l'acide gras (AG) α -linoléique (18: 3). JA constitue un membre clé de la voie de la famille chimiquement diversifiée d'AG oxygénés appelés oxylipines, dont beaucoup sont également impliqués dans la défense des plantes contre les stress biotiques et abiotiques (Lim *et al.*, 2017). La ETI, précède généralement une réponse systémique généralisée à la plante entière plus lente à se mettre en place, qui conduit finalement à la résistance systémique acquise ou SAR (Abd El Rahman, 2011). La SAR offre une résistance à large spectre et durable contre les agents pathogènes des plantes (Fu et Dong, 2013). Plusieurs facteurs sont impliqués en tant que régulateurs des gènes PR (Pathogen-Related) pendant la signalisation de défense médiée par la SAR et ces régulateurs de signalisation peuvent interagir de manière synergique et/ou antagoniste pour affiner les défenses des plantes contre les agents pathogènes (Savadi *et al.*, 2018). Ces défenses inductibles s'accompagnent d'une reprogrammation transcriptionnelle approfondie des gènes liés à la défense (Espinass *et al.*, 2016).

1.3.5.2. La résistance de la pomme de terre à la gale commune

La résistance et la défense de la pomme de terre à la gale commune ne suit pas un modèle typique de la résistance des plantes qui consiste en un gène de résistance répondant à un agent pathogène et déclenchant une réponse de défense (Dees et Wanner, 2012). Il n'y a pas beaucoup de données sur une réponse de défense de la plante à la bactérie ou à la thaxtamine dans la pomme de terre. Dans des cultures tissulaires d'*Arabidopsis* et de tabac, des influx de calcium et des modifications du pH extracellulaire représentant deux caractéristiques précoces classiques des réponses de défense, sont induites par la thaxtamine (Tegg and Wilson, 2010). Il a été démontré qu'il y a une variation dans la sévérité des symptômes de la gale commune chez une population tétraploïde en ségrégation indiquant une génétique complexe de la résistance (Driscoll *et al.*, 2009). Le mécanisme et la génétique de la tolérance à la gale commune reste à comprendre.

1.3.5.2.1. Le périoderme et la résistance aux attaques pathogènes

Pour se protéger contre les différents stress biotiques et abiotiques, les plantes ont développé des barrières naturelles contre les pertes d'eau et l'invasion de certains agents pathogènes. Un exemple de ces barrières naturelles, le périoderme, qui existe dans les organes aériens et souterrains qui conçoivent une croissance secondaire tels que les tiges, les racines et les tubercules (Bernards, 2002). La couche des cellules épidermiques originales ne subsiste pas longtemps. Elle est remplacée par le périoderme qui se compose de trois types cellulaires : le phellème, le phellogène et le phelloderme (Fogelman *et al.*, 2015). Le phellogène est un méristème secondaire. Ce tissu générateur adapte la structure du tubercule en fonction de son accroissement interne. Il produit deux tissus, soit du suber vers l'extérieur, un tissu de protection mort contenant de la subérine (un hétéropolymère de lipides et de composés phénoliques) qui rend les cellules imperméables à l'eau, soit vers l'intérieur, il produit un tissu vivant, le phelloderme qui joue un rôle de réserve (Lulai, 2001). Il a été démontré que la teneur du périoderme en acides phénoliques jouait un rôle dans la résistance de la pomme de terre à la gale commune. Tous les cultivars de pomme de terre à peau rouge, moins sensibles à la gale commune, se sont généralement révélés riches en acide phénolique dans leurs pelures (Singhai *et al.*, 2011). D'autre part, l'effet de la subérine sur la biosynthèse de

la TA et l'expression des gènes impliqués dans sa voie de biosynthèse a été analysé. Il a été démontré que la subérine semble stimuler le début du métabolisme secondaire, qui est une condition préalable à la production de molécules telles que la thaxtomine A (Lerat *et al.*, 2010). Le périoderme représente le tissu de revêtement du tubercule. C'est la région la plus pauvre en termes de grains d'amidon. Il est plus généralement connu sous le nom de pelure ou de peau. Sa formation commence à partir du moment où le bout du stolon gonfle et se poursuit jusqu'à ce que le tubercule arrête sa croissance par la sénescence de la plante ou par la récolte (Fogelman *et al.*, 2015). La différenciation du périoderme du tubercule de la pomme de terre nécessite l'expansion des cellules, un intense dépôt de subérine et un programme de sénescence qui aboutit à la mort cellulaire (Sabba, 2002). La subérine peut également fournir une certaine résistance contre l'invasion de quelques agents pathogènes (Fogelman *et al.*, 2015). Elle peut représenter une barrière à la diffusion des enzymes ou des toxines produites par ces agents ou agir comme un obstacle structurel à l'inclusion de l'agent pathogène (Fogelman *et al.*, 2015; Kolattukudy, 1984). Au niveau du périoderme, les échanges gazeux sont assurés par les lenticelles, qui se développent à partir d'une expansion des cellules du périoderme vers l'extérieur du tubercule (Figure 5). Il est connu que la majorité des cellules des lenticelles sont subérifiées, mais ceci n'empêche pas que les lenticelles peuvent être des sites d'entrée pour les agents pathogènes (Thangavel *et al.*, 2016a).

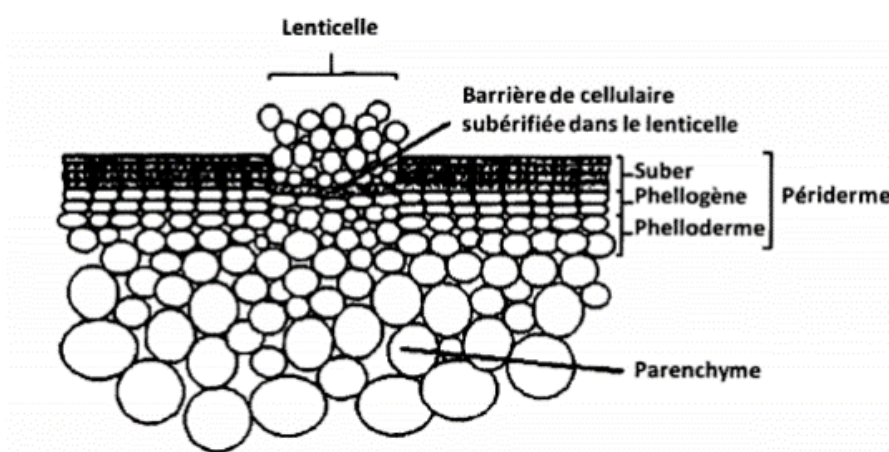


Figure 5. Diagramme d'une coupe longitudinale d'un tubercule de pomme de terre qui montre la structure du périoderme et d'une lenticelle (Tyner *et al.*, 1997).

À la récolte, le périoderme est encore fragile et sensible aux blessures ainsi qu'aux dommages mécaniques. Pendant les deux ou trois semaines suivant la récolte, le périoderme atteint la maturité en développant une couche lipidique complète lui servant de couverture (Schreiber *et al.*, 2005). Il devient très attaché au reste des cellules du tubercule et développe ainsi ses propriétés de barrière contre la perte d'eau. En effet, la différence physiologique du périoderme des tubercules peut représenter l'une des raisons de la susceptibilité ou de la résistance de certains cultivars vis-à-vis de la gale commune. Il a été démontré par Tegg *et al.* (2011) que le nombre de couches du périoderme et l'excès de la subérisation des lenticelles des tubercules peuvent déterminer la résistance à la gale commune et à la gale poudreuse. Parmi les réponses qui sont induites lors des dommages cellulaires, suite à une blessure ou d'autres types de stress, on note l'induction de la subérisation du site de blessure. Cette subérisation concerne deux ou trois couches de cellules parenchymateuses pour former une couche de fermeture (Vreugdenhil *et al.*, 2011).

Il existe aussi des études intéressantes dans la littérature qui montrent que le périoderme est impliqué dans l'acquisition de la résistance du tubercule à la gale commune. L'équipe de Wilson qui a sélectionné des clones de cals après les avoir mis en contact avec de fortes concentrations de TA (Wilson *et al.*, 2009), a examiné histologiquement les tissus des périodermes à partir de clones résistants et de leurs parents susceptibles suivant leur réponse à la toxine et aux agents pathogènes (Thangavel *et al.*, 2016a). Ils ont trouvé qu'il y a plus de couches cellulaires de phellème, avec accumulation de subérine dans ces tissus. Ces changements sont accompagnés par une surexpression des gènes associés à la biosynthèse de subérine. Par contre, il n'y a pas eu de changements au niveau de l'expression des gènes associés à la réaction de défense (Thangavel *et al.*, 2016a).

1.3.5.2.2. Résistance chimique

Des recherches antérieures ont démontré que les cultivars résistants à la gale commune sont capables de détoxifier la TA par glycosylation (Tegg et Wilson, 2010). Ces cultivars ont une activité glucose transférase plus élevée que les cultivars plus sensibles à la gale commune. Probablement que les tubercules des cultivars résistants à la gale commune ont

été capables de convertir la thaxtomine en une forme glycosylée (A- β -di-o-glucose-thaxtomine A) moins toxique de la thaxtomine A (Tegg et Wilson, 2010).

1.3.5.2.3. Résistance des cultivars

L'utilisation de cultivars résistants à la maladie est une des méthodes les plus efficaces et respectueuses de l'environnement. Le niveau de résistance de la pomme de terre à la gale commune varie d'un cultivar à l'autre et jusqu'à aujourd'hui aucun d'eux n'est totalement résistant (Somerhausen, 2003 ; Aznar *et al.*, 2015). De plus, il y a une grande diversité dans les souches de *S. scabies* ce qui rend plus complexe le développement de cultivars résistants à toutes les souches. L'équipe australienne du Dr. Wilson (2009) a développé une méthode pour sélectionner des individus résistants de cultivars commercialement connus. Tel que mentionné plus haut, ils ont exploité par leur approche la diversité clonale en exposant des cals obtenus par la culture *in vitro* à de fortes concentrations (4,57 μ M) de thaxtomine A. Seulement les cellules qui ont survécu à la TA ont été régénérées en plantes qui ont été testées pour leur résistance à la maladie. Une proportion d'environ 1/3 des clones, ce qui correspond à 39 sur 113 amas de cellules sélectionnées, qui ont été régénérés en plantes potentiellement plus résistantes à la gale commune, dont 13 étaient significativement plus résistants à la gale commune (Wilson *et al.*, 2009). Ce résultat est très encourageant pour les autres recherches à venir, surtout que les plants résistants gardaient leurs propriétés agronomiques et culinaires d'origine. Il est clair que d'autres recherches plus approfondies sont indispensables afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et le rôle des gènes qui pourraient être impliqués dans la résistance à la gale commune. Certains des cultivars utilisés au Québec tel que Russet Burbank, Superior, Divina et Goldrush sont considérés comme très tolérants à la gale commune (Parent, 2008) mais puisque la résistance n'est pas totale à la maladie, même ces cultivars sont susceptibles d'être infectés dans des conditions où il y a une forte présence de l'agent pathogène avec des conditions environnementales favorisant l'infection (Wharton *et al.*, 2007). De plus, un cultivar peut être plus résistant à l'une des souches bactériennes causant la gale commune et sensible à une autre souche, ce qui rend plus difficile le choix du cultivar (Somerhausen, 2003). En résumé, la façon la plus efficace pour réduire significativement l'incidence de la gale serait de combiner plusieurs

des solutions précédentes dans une lutte intégrée pour pouvoir affronter *S. scabies* sur plusieurs plans.

1.3.5.2.4. Variation somaclonale

Pour améliorer la résistance des plantes à des stress biotiques et abiotiques, la sélection *in vitro* basée sur la culture tissulaire est devenue une méthode intéressante et rentable. Cependant, la culture de tissus végétaux peut générer une variabilité génétique considérable, telle que des variations somaclonales résultant d'une mutation génétique ou de changements épigénétiques. Ces variations sont dues aux conditions de stress auxquelles les tissus végétaux sont exposés lors de la culture *in vitro*, telles que la stérilisation et les blessures, la composition des milieux ou également des conditions environnementales non optimales (Weckx *et al.*, 2019). L'apparition de variations somaclonales n'est pas souhaitable pour le clonage *in vitro* ou pour la conservation du matériel génétique, mais c'est un moyen simple d'obtenir une variabilité génétique ne nécessitant pas de méthodes sophistiquées (Krishna *et al.*, 2016). Il a été démontré que des plantes tolérantes au stress peuvent être obtenues en utilisant des agents éliciteurs tels que le NaCl (pour la tolérance au sel), le mannitol (pour la tolérance à la sécheresse), une phytotoxine ou l'agent pathogène lui-même dans la culture du milieu de contrôle (pour la résistance aux maladies) (Rai *et al.*, 2011). En ce qui concerne la durabilité de ces variations, des recherches antérieures menées dans notre laboratoire ont montré que les cellules de peuplier habituées à la TA restaient résistantes à la toxine après plusieurs cycles de division, même en l'absence de TA (Brochu *et al.*, 2010). La phytotoxine TA a également été utilisée pour éliminer la descendance sensible à la gale commune d'une population reproductrice de pommes de terre (Hiltunen *et al.*, 2011). La TA a aussi été utilisé en tant qu'un moyen de sélection pour développer des mutants plus résistants à la gale commune (Wilson *et al.*, 2009).

1.3.5.3. Autres moyens de lutte contre la gale commune

Les méthodes de lutte qui sont généralement utilisées par les producteurs sont reliées au cycle de la maladie et aux conditions qui en favorisent le développement. Ce sont majoritairement des approches culturales.

1.3.5.3.1. Rotations des cultures

La rotation des cultures est une bonne méthode de lutte contre la gale commune, et peut aussi être combinée avec d'autres méthodes pour avoir plus d'efficacité. C'est la rotation de la culture de la pomme de terre avec celles des céréales et de luzerne qui s'est montrée la plus performante (Wharton *et al.*, 2007). La rotation avec d'autres cultures hôtes à *S. scabies* est évidemment à éviter pour empêcher le développement et le maintien de l'inoculum bactérien dans le sol (Wharton *et al.*, 2007).

1.3.5.3.2. Caractéristiques des sols et les amendements

Tel que mentionné avant, un pH de sol au-dessus de 5,2 favorise la croissance de *S. scabies* et accroît la sévérité de la gale commune. Cependant, les espèces *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* tolèrent un pH plus faible que celui toléré par *S. scabies* (Dees et Wanner, 2012). Un moyen de perturber le développement de la maladie serait donc d'acidifier le sol, ce qui peut être fait en utilisant des fertilisants soufrés et en évitant le chaulage avant la culture de la pomme de terre (Wharton *et al.*, 2007). Plusieurs études ont démontré qu'il y a une diminution des symptômes de la maladie de la gale commune lorsque le pH était acidifié (Sturz *et al.*, 2004; Pavlista, 2005). Les sols sablonneux ou à texture grossière représente des milieux plus adéquats au développement de la gale à cause de leur faible capacité de rétention d'eau. Autre chose à éviter, l'ajout de matières organiques non décomposées, ce qui peut favoriser les infections à la gale commune (Wharton *et al.*, 2007). L'humidité du sol durant la tubérisation est à prendre en considération car un sol sec favorise la croissance de *S. scabies*. Par conséquent, le maintien de l'humidité du sol près de la capacité au champ durant 4 à 6 semaines après l'initiation de la tubérisation, pourrait réduire l'infection par *S. scabies* (Wharton *et al.*, 2007). Cette méthode n'est pas facile à appliquer car c'est un peu difficile de maintenir ce niveau d'humidité dans certains sols et on peut ainsi augmenter les risques d'autres problèmes phytosanitaires. Autre point aussi important, il faut être sûr que l'agent pathogène est bien *S. scabies* et non pas *S. acidiscabies* qui est favorisée par l'humidité (Somerhausen, 2003). D'autre part, la gestion de la nutrition minérale peut réduire la gravité d'un certain nombre de maladies importantes de la pomme de terre (Lambert *et al.*, 2005). Par exemple, il a été démontré que les agents pathogènes et leurs hôtes sont en

compétition pour le fer (Aznar *et al.*, 2015) et que l'infection des feuilles de la pomme de terre par *Phytophthora infestans*, agent pathogène du mildiou, a été considérablement réduite en ajoutant de la déféroxamine, un agent exogène chélateur du fer (García Mata *et al.*, 2001).

1.3.5.3.3. Les traitements chimiques et biologiques

1.3.5.3.3.1. La fumigation

Il existe deux formes principales de fumigation : la bio-fumigation et la fumigation chimique. La bio-fumigation permet de favoriser le dégagement de substances volatiles toxiques qui se produisent lors de l'enfouissement d'engrais verts à base de plantes de la famille des *Brassica spp.* (Canola, moutarde, colza, chou, etc.). Les plantes *Brassica sp* pour se défendre contre les herbivores produisent une enzyme, la myrosinase, (thioglucoside glucohydrolase E.C. 3.2.3.147), seule glucosidase connue à ce jour, capable d'hydrolyser des composés thiosacchari-di-quesqui sont des composés bio-actifs à large spectre d'activité (antifongique, antibactérienne, insecticide). La myrosinase est contenue dans des vacuoles. Lors des bris cellulaires, la myrosinase peut entrer en contact avec les glucosinolates accumulés dans les tissus végétaux, les dégrader en divers intermédiaires volatiles toxiques du type thiocyanates, isothiocyanates ou nitriles. Ces plantes contiennent des composés soufrés, les glucosinolates, qui sont relâchés dans le sol quand on hache et broie la plante et qu'on l'enfouit rapidement. Certains microbes du sol produisent une enzyme qui dégrade les glucosinolates pour produire un gaz, l'isothiocyanate, toxique pour les microorganismes du sol. Différents essais avec cette méthode ont donné des résultats intéressants (Hilton *et al.*, 2006). Par contre, cette méthode demande encore d'autres vérifications car les effets sur la gale commune varient selon les conditions climatiques.

La fumigation chimique du sol à la chloropicrine, un pesticide qui permet de contrôler la gale commune d'une manière efficace et constante, a donné des résultats intéressants réduisant l'incidence et la sévérité de la gale commune. Pour être efficace, la chloropicrine doit être appliquée 30 j au moins avant le semis des tubercules (Rouse, 2007). Il faut donc appliquer le pesticide à l'automne précédent la plantation pour les régions situées plus au Nord comme le Québec. Malgré son efficacité, l'application de ce pesticide est à refaire

chaque année. De plus, elle est très coûteuse et surtout nocive pour l'environnement (Boulet, 2007).

1.3.5.3.3.2. Traitement à l'auxine

L'auxine est une hormone végétale, appelée aussi phytohormone. L'auxine est synthétisée principalement dans les jeunes feuilles à partir du tryptophane et est activement transportée vers les autres tissus de la plante pour en coordonner la croissance et faciliter les réponses aux variations de l'environnement (Zhao, 2012). À part le rôle important de l'auxine dans quasiment tous les mécanismes de développement de la plante, elle joue aussi un rôle dans la réponse de la plante face aux agents pathogènes. Il a été rapporté dans la littérature que l'application foliaire de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) ou l'acide 3,5 dichlorophénoxyacétique (3,5-D), deux auxines synthétiques, peut protéger la pomme de terre contre la gale commune (Thompson, 2013). Il a été démontré que l'application foliaire de 2,4-D et de 3,5-D réduisait la gale commune de 45 % et 87 % respectivement comparés aux témoins non traités (Thompson, 2013). Il a été suggéré que le 2,4-D appliqué 5 j après la levée de la majorité des plantes est retenu dans la plante jusqu'à l'initiation des tubercules (Thompson, 2013). Une fois que les tubercules sont en développement, le 2,4-D est transféré vers les tubercules et induit un bon contrôle de la maladie par rapport aux pulvérisations appliquées plus tard (après l'initiation de la tubérisation). D'autre part, une compagnie Agro 100 a mis sur le marché un produit Procure à base de 2,4-D, ils ont démontré que ce produit peut réduire la sensibilité de la pomme de terre à la gale commune (agro-100.ca).

1.4. Résultats antérieurs et hypothèses

Dans notre laboratoire une méthode a été développée pour augmenter la résistance de certains cultivars de pomme de terre à la thaxtmine A et éventuellement à la gale commune. Elle consiste à habituer les cellules de la pomme de terre à la TA. Cette méthode a permis de régénérer des somaclones qui ont montré une plus grande résistance à la gale commune. D'autre part, différents travaux ont été effectués par une équipe australienne sur l'effet protecteur du 2,4-D contre la gale commune indiquent que le traitement au 2,4-D appliqué

juste après l'émergence diminue la sensibilité des tubercules à la TA et à la gale commune (Thompson, 2013).

Ce projet est partagé en deux volets. Les objectifs du premier volet ont été identifiés à partir des hypothèses émises en fonction des résultats des tests d'habituation préliminaires effectués dans notre laboratoire. Des variants somaclonaux habitués à la thaxtamine A ont déjà été produits chez le cultivar Russet Burbank (Ducharme, 2014) et Yukon Gold. Les cals ont été produits à partir des entre-nœuds de tiges des boutures de pommes de terre Russet Burbank ou Yukon Gold cultivées *in vitro*, puis transférés après trois semaines sur un milieu MS contenant des concentrations de plus en plus élevées de TA. La concentration initiale utilisée pour l'habituation était de 0,2 μM de TA qui a été augmentée graduellement jusqu'à 0,8 μM TA, une concentration létale pour les cals non habitués des cultivars Russet Burbank ou Yukon Gold. Lors de chaque transfert sur le nouveau milieu, une partie des cals a été transférée sur un milieu de régénération qui ne contenait pas de la TA. Chacun des régénérants cultivés est à l'origine d'un somaclone distinct numéroté et propagé *in vitro* par culture de boutures. Les somaclones ont été testés pour leur résistance à la TA et à la gale commune.

Les somaclones de pommes de terre avec une plus grande résistance à la TA ont été inoculés par *S. scabiei* dans des pots et ont été testés pour la résistance à la gale commune. À la suite de cette expérience, un somaclone a été sélectionné comme étant le plus résistant à la gale commune, Russet Burbank 9 (Beaudoin, rapport de recherche, 2012). L'hypothèse de départ était que l'habituation à la TA pouvait induire des changements (variations somaclonales) qui contribuent à augmenter la résistance à la gale commune chez le somaclone RB9. Une étude protéomique a été réalisée pour identifier quels changements du protéome du tubercule pourraient contribuer à augmenter la résistance à la gale commune et à la TA. Des différences ont été observées au niveau de certaines protéines telles que les patatines et les inhibiteurs de protéase (Kunitz). Le deuxième cultivar adapté à la TA est le cultivar Yukon Gold. À partir de ce cultivar, plusieurs somaclones habitués à la TA ont été régénérés. Les somaclones YG8 et YG32 semblent être plus résistants à la gale commune. En partant de ces résultats préliminaires et du fait que généralement la mise en place de la défense de la plante est accompagnée de changements au niveau du protéome et au niveau des barrières

structurales, les hypothèses émises sont les suivantes : 1) La tolérance à la gale commune obtenue suite à l'habituation des cals à la TA est maintenue au fil des générations, 2) la méthode d'habituation des cals à la thaxtamine A doit pouvoir être appliquée à d'autres cultivars de pomme de terre, 3) des changements au niveau du protéome des tubercules sont impliqués dans la résistance à la gale commune, 4) des changements au niveau du périoderme sont impliqués dans la résistance à la gale commune.

Les objectifs du deuxième volet de ce projet dérivent des hypothèses émises à partir des résultats de la littérature. Différents travaux ont été effectués par une équipe australienne sur l'effet protecteur du 2,4-D contre la gale commune (Thompson, 2013). Leurs principaux résultats indiquent que le traitement au 2,4-D appliqué juste après l'émergence diminue la sensibilité des tubercules à la TA et à la gale commune (Thompson *et al.*, 2013). Ils ont aussi mentionné que le 2,4-D n'a pas d'effet direct sur l'agent pathogène ni sur sa virulence mais qu'en fait il a une action indirecte sur les tubercules (Tegg *et al.*, 2008). Cependant, on ne savait toujours pas comment le 2,4-D permettait d'augmenter la tolérance à la gale commune. Il était donc intéressant d'identifier les changements induits par le 2,4-D dans les tubercules de pomme de terre afin de mieux comprendre comment ils devenaient plus résistants à la maladie. En se basant sur ces résultats, une cinquième hypothèse a été émise: 5) La résistance à la gale commune induite par le 2,4-D est associée à des changements dans le protéome et/ou au niveau du périoderme.

1.5. Objectifs du projet

Nos objectifs pour ce projet sont pour le premier volet: 1) confirmer la résistance des somaclones YG8 et YG32 à la gale commune et caractériser ces somaclones pour comprendre l'origine de la résistance en évaluant les changements protéiques acquis et les changements au niveau du périoderme suite à l'habituation et l'acquisition de la résistance; 2) mettre au point la méthode de l'habituation et l'appliquer à de nouveaux cultivars et évaluer leur résistance à la gale commune. Pour le deuxième volet de ce projet, un troisième objectif a été mis en place qui est de confirmer l'effet du traitement au 2,4-D pour protéger la pomme de terre contre la gale commune et évaluer les changements au niveau du protéome et du périoderme chez les tubercules de plants traités au 2,4-D.

1.5.1. Objectif 1: Confirmation de la résistance des somaclones YG8 et YG32 à la gale commune et caractérisation

En ce qui concerne le cultivar Yukon Gold, des tests préliminaires réalisés en chambre de croissance et en serre ont permis d'identifier des somaclones plus résistants à la gale commune que le cultivar de départ. Cet objectif consistait d'abord à confirmer cette résistance et à choisir parmi les somaclones obtenus ceux qui sont les plus intéressants du point de vue résistance à la gale commune. Pour ceci, des infections en pots avec *S. scabies* ont été effectués et la sévérité des symptômes sur les tubercules de chaque somaclone comparés à ceux du parent a été évaluée. Ceci a été fait en notant différents paramètres, le poids des tubercules, la surface infectée par la gale commune pour chaque tubercule, la profondeur des lésions et l'indice de gale commune. La deuxième partie de cet objectif consistait à caractériser les somaclones résistants à la gale commune, à comprendre quels changements des tubercules ont permis l'augmentation de la résistance à la gale commune. Pour ceci, les protéomes des somaclones confirmés comme plus résistants ont été comparés à celui du cultivar Yukon Gold d'origine afin d'identifier quelles protéines sont impliquées dans ce changement. Une approche d'analyse protéomique quantitative « Label free » a été utilisée. Les résultats de cette partie devaient permettre de cerner les mécanismes qui sont impliqués dans l'augmentation de la résistance de la pomme de terre à la gale commune.

Afin de vérifier l'implication du périoderme dans la résistance des tubercules à la gale commune, les changements au niveau du périoderme suite à l'habituation à la TA ont été également évalués. La microscopie à fluorescence a été utilisée pour vérifier les changements au niveau des couches cellulaires subérifiées ainsi que l'agencement des cellules (En collaboration avec Marc Antoine Turcotte). L'effet de la subérine extraite des tubercules des somaclones et du cultivar parent sur le développement de la bactérie et sa production en TA a aussi été vérifié (En collaboration avec Sylvain Lerat).

1.5.2. Objectif 2: Habituation de nouveaux cultivars à la TA et évaluation de leur résistance à la gale commune.

Pour cet objectif, la méthode de l'habituation des cals à la TA a été appliquée à de nouveaux cultivars du Québec. Cette partie a nécessité des mises au point pour adapter la méthode de formation de cals, de régénération et d'habituation à différents cultivars qui n'ont pas les mêmes réponses aux conditions de la culture *in vitro*. À partir des embryons somatiques obtenus à partir des cals habitués à la TA, des somaclones de pomme de terre ont été régénérés et vérifiés pour leur résistance à la gale commune par des tests d'infection.

1.5.3. Objectif 3 : Analyse des effets du traitement au 2,4-D pour protéger la pomme de terre contre la gale commune

Le troisième objectif consistait à étudier comment l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) peut protéger les plants de pomme de terre contre la gale commune. Le premier sous-objectif était de confirmer que le traitement au 2,4-D induit une résistance à la gale commune. Ce sous-objectif a été réalisé en effectuant des infections en pots et en évaluant les symptômes avec ou sans traitement. En second lieu, une approche quantitative d'analyse protéomique a été utilisée dans le but de vérifier les changements au niveau du protéome suite au traitement foliaire au 2,4-D. Finalement, notre troisième sous-objectif était de vérifier chez les tubercules dont les plants ont été traités au 2,4-D, si la rigidité et/ou l'épaisseur des couches du périderme était altérée. Le périderme des tubercules provenant de plants traités au 2,4-D et le périderme de tubercules des plants témoins ont été comparés pour voir si la subérine contenue dans ces tubercules a un effet sur la croissance de la bactérie et sa pathogénicité.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Cultivars de pomme de terre

Les cultivars de pomme de terre utilisés pour ce projet sont des cultivars commerciaux ou en cours d'évaluation au Québec et cultivés pour leurs qualités agronomiques. Ces cultivars avaient des niveaux variables de résistance à la gale commune causée par *S. scabies*. Yukon Gold et Russet Burbank ont été utilisés dans la partie habitude comme témoins puisqu'ils avaient déjà été adaptés à la TA. Les autres cultivars utilisés pour l'habitude à la TA sont Roselys, Primevère, Shepody, Campagna, EXP 704.10 et Dark red chieftain (Tableau 1).

Tableau 1. Les cultivars de pomme de terre utilisés dans le projet (ACIA, 2013).

Cultivars	Sensibilité à la gale commune
Russet Burbank	Modérément résistante
Shepody	Très sensible
Yukon Gold	Très sensible
Roselys	Modérément sensible
Primevère	Modérément sensible
Campagna	Pas encore confirmée (cultivars en cours de développement)
Exp704.10	Pas encore confirmée (cultivars en cours de développement)

2.2. Multiplication et maintien des boutures

Les plantules de pomme de terre ont été maintenues et multipliées en conditions stériles, sur milieu de maintien Murashige et Skoog (MS) contenant 4,3 g de MS (Sigma, Oakville, On, Ca) par litre d'eau distillée, 3 % de saccharose et 0,7 % de bactoagar (Becton et Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), pH 5,7. Le bouturage s'est fait en coupant des tiges en sections de 1 à 2 cm environ portant un ou plusieurs nœuds transférés sur milieu de maintien aux 2 mois, dans des contenants de style Magenta GA7 (77 mm x 77 mm x 97 mm) de la compagnie PhytoTechnology Laboratories (Lenexa, KS, USA) avec 5 boutures par contenant. Les plants ont été maintenus en cabinet de croissance (Sanyo Scientific, Wood Dale, IL, USA) à 22 °C, avec une photopériode de 16 h de lumière (7 300 lux) et 8 h d'obscurité.

2.3. Extraction et purification de la TA

La TA utilisée dans les différentes expériences a été extraite et purifiée dans le laboratoire suivant un protocole de Goyer *et al.*, (1998). En bref, la souche EF-35 (Faucher *et al.*, 1992) de *S. scabies* a été cultivée dans un milieu de son d'avoine en agitation pendant 5 à 8 j à une température de 30 °C à l'obscurité. Ensuite, les cultures ont été centrifugées pour récupérer le surnageant contenant la TA qui a été extraite deux fois avec de l'acétate d'éthyle. Le surnageant contenant la TA a été concentré par évaporation et la TA a été purifiée par chromatographie sur couche mince utilisant des plaques enduites de 0,25 mm de gel de silice 60. La TA qui est le composé jaune avec un Rf de 0,27 a été récupérée en utilisant un mélange de chloroforme-méthanol (7 : 3). Ensuite, ce composé a été dissous dans du méthanol (MeOH) à une concentration de 0,01 M. Finalement, la TA a été quantifiée par chromatographie liquide à haute performance à 249 nm, en utilisant un chromatographe liquide Varian LC5 500 équipé d'une colonne C18 (10 µm, 3,9 X 300 mm), en effectuant une élution avec un gradient d'acétonitrile de 25 à 75 % pendant 10 min à un débit de 1,3 ml min⁻¹. Les quantités de thaxtamine A ont été déterminées à l'aide d'une courbe standard en utilisant des quantités connues de thaxtamine A purifiée.

2.4. Production des cals de pomme de terre

La formation de cals a été effectuée sur deux milieux décrits précédemment par Jayasree *et al.*, (2001) et par Wilson *et al.*, (2009). Brièvement, le premier milieu (Jayasree) est le même que celui qui a été utilisé pour le maintien et la multiplication des plantules avec l'addition de 1 ml l⁻¹ de vitamine MS 1 000 x, 0,9 µM d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et 10 µM de benzyladenine (BA) de la compagnie Sigma-Aldrich (Sigma, Oakville, On, Ca). Pour le deuxième milieu (Wilson), on a rajouté à 1 L de milieu de maintien 1 ml de vitamine MS 1 000 x, 1,1 µM de 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 8,9 µM BA et 14,4 µM de l'acide gibbérellique (GA₃). La formation de cals a été faite à partir des entre-nœuds de tiges des plantules de pomme de terre cultivées in vitro âgées d'environ 4 semaines. Des sections de 1 cm d'entre-nœuds ont été déposées sur le milieu de production de cals, en assurant un bon contact entre le milieu et le tissu végétal, et incubés dans un cabinet de croissance (Sanyo Scientific, Wood Dale, IL, USA) à une température de 20 °C à l'obscurité. Les entre-nœuds ont été repiqués aux 3 à 4 semaines sur milieu de production de cals, selon la vitesse à laquelle les cals se développaient.

2.5. Habituation des cals

L'habituation de cals consiste à les cultiver en présence de TA, avec des concentrations de plus en plus élevées de toxine ajoutée au milieu de formation de cals. La concentration de départ (0,2 µM) a été sélectionnée après avoir constaté que c'était la concentration la plus élevée sous laquelle les entre-nœuds de RB et de YG pouvaient former des cals. La concentration a été augmentée de 0,1 µM aux 4 semaines, jusqu'à ce que les cals soient capables de croître en présence de 0,7 à 0,8 µM, soit environ 30 semaines. Tout au long de cette expérience, des cals ont été transférés sur un milieu de formation d'embryons somatiques, pour avoir des niveaux d'habituation différents et pour s'assurer que l'habituation ne leur fait pas perdre leur capacité à se régénérer. Pour chaque traitement, des cals ont été produits sur un milieu témoin contenant le même volume de méthanol, qui est le solvant dans lequel la TA était diluée.

2.6. Régénération d'embryons somatiques de pomme de terre

Pour la régénération d'embryons somatiques, deux milieux ont été utilisés également. C'est encore une fois le milieu de maintien et de multiplication des plantules décrit plus haut, supplémenté avec 10 μM BA (Sigma-Aldrich) et 22,8 μM de zéatine (Zea) (*PhytoTechnology Laboratories*) pour le premier milieu (JayaSree *et al.*, 2001). Pour le deuxième milieu, il a été rajouté au milieu MS basique 1,1 μM NAA, 4,6 μM Zea et 14,4 μM GA₃ (Wilson *et al.*, 2009). À la suite de la formation des embryons somatiques, ces derniers ont été excisés du cal et transférés sur le milieu basal de maintien pour qu'ils produisent des racines et qu'ils se développent.

2.7. Évaluation de la résistance à la gale commune

Pour évaluer la résistance à la gale commune des somaclones Yukon Gold, adaptés auparavant à la TA, un protocole inspiré de Faucher *et al.*, (1992) a été suivi. Dans cet essai, des boutures de Yukon Gold ont été infectées par les bactéries *S. scabies* souche EF-35 (Faucher *et al.*, 1992). La culture des bactéries et la multiplication des boutures ont débuté environ un mois avant l'infection en pots. Les différents somaclones à tester ont été multipliés, à raison de 15 boutures par somaclone pour avoir assez de matériel végétal pour l'expérience.

2.7.1. Production de mycélium de *Streptomyces scabies*

À partir d'une culture dense de 20 μl de spores de *S. scabies* EF-35 dans 25 ml de YME, 1 ml a été étalé sur un pétri contenant le milieu YMEA plus CaCO₃ (4 g/l de glucose, 4 g/l de Yeast extract, 10 g/l de malt extract, 15 g/l d'agar et 1 g/l de CaCO₃). Ces cultures ont été incubées à 30 °C, à l'obscurité, pendant 5 à 7 j puis les géloses ont été découpées en cubes de 1 cm³. Ensuite, des contenants « Magenta » pour la culture du mycélium de la bactérie ont été préparés. Ces contenants ont été remplis à trois quarts du volume de vermiculite avant d'être stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes. Ensuite, un volume de 80 ml de solution SAY (20 g/l de sucrose, 1,2 g/l de l-asparagine, 0,6 g/l de K₂HPO₄ et 10 g/l d'extrait de levure) a été ajouté dans chaque Magenta pour saturer la vermiculite. Par la suite, les carrés

découpés dans la culture ont été déposés dans les Magenta, à l'envers, sur la vermiculite et incubés à 30 °C pendant 2 à 3 semaines à l'obscurité.

2.7.2. Test d'infection à la gale commune en pots (en chambre de croissance ou en serre)

Des pots désinfectés ont été utilisés pour l'infection des plantules. Avant leur transfert, des boutures de 5 à 6 semaines, provenant des cultures *in vitro* des cultivars parent et des somaclones habitués à la TA, ont été placées trois jours dans une chambre de croissance (Conviron MTR30) maintenue à 22 °C le jour et 16 °C la nuit avec une photopériode de 16 h j⁻¹ en laissant les Magenta entre ouvertes pour l'acclimatation des boutures. Ensuite, les boutures ont été transférées chacune en pots de 15 cm de diamètre remplis aux trois quarts d'un mélange de sable : vermiculite (2:1), ce mélange a été stérilisé à l'autoclave durant 1 h avant d'être mis en pots. Pour les traitements avec infection, de la vermiculite inoculée par *S. scabiei* souche EF-35 a été rajoutée à ce même mélange à raison de 1 l pour 20 l. Après la plantation, les pots ont été déposés dans une serre à Sainte Croix (QC) pendant tout l'été ou en chambre de croissance en limitant l'irrigation pour favoriser l'infection. Les plants ont été arrosés 2 fois par semaine avec 50 ml d'eau en ajoutant une fois par semaine un fertilisant 20-20-20. Après environ 40 j dans la chambre de croissance, le cycle a été changé en jours plus courts, soit 12 h jour /12 h obscurité, à 22 °C le jour et 16°C la nuit. Pour les expériences en serre, la lumière et la température dépendaient des conditions estivales. Finalement, les tubercules de chaque traitement ont été récoltés, évalués et comparés en considérant le nombre et le poids des tubercules ainsi que la sévérité des symptômes de la gale commune.

2.7.3. Infection par bourgeons foliaires

Pour cette expérience, des feuilles avec un bourgeon foliaire ont été coupées à partir de plantes dont la tubérisation a été initiée depuis un mois (changement en jours plus courts). Ces feuilles ont ensuite été immergées dans des bacs contenant de la vermiculite infectée par *S. scabies* à raison de 1 l de vermiculite infectée pour 20 l de vermiculite non infectée. Les feuilles ont été vaporisées avec de l'eau à chaque jour et 100 ml d'eau ont été rajouté dans le bac deux fois par semaine. Après 2 ou 3 semaines, les mini tubercules ont été récoltés

pour évaluer leur résistance à la gale commune, les tubercules ont été photographiés et les images ont été analysées en utilisant le Logiciel ImageJ (Caraza-Harter et Endelman, 2019).

2.7.4. Évaluation des tubercules et de la sévérité des symptômes de la gale commune

Après récolte des tubercules, les paramètres qui ont été évalués sont le poids des tubercules, le pourcentage de tubercules infectés, la profondeur des lésions, le pourcentage de surface infectée et l'indice de sévérité de la maladie suivant une échelle adaptée de l'ACIA qui varie de 0 à 6. Ce qui correspond à : 0 = aucune infection ; 0,5 moins de 1 % de surface infectée ; 1 = 1 à 5 % de surface infectée ; 2 = 6 à 10 % de surface infectée; 3 = 11 à 35 % de surface infectée; 4 = 36 à 50 % de surface infectée; 5 = 51 à 75 % de surface infectée; 6 = 76 à 100 % de surface infectée.

2.8. Effet du 2,4-D dans la résistance à la gale commune

2.8.1. Traitement au 2,4-D en chambre de croissance

Cet essai a été effectué avec des tubercules de Russet Burbank, les tubercules ont été laissés à germer à l'obscurité avant de les transférer en pots. Les pots ont été préparés comme cité auparavant. Pour les témoins, les pots contenaient du sable et de la vermiculite à raison de 2:1 et les pots infectés contenaient le même mélange de sable et de vermiculite auquel ont été rajoutées les bactéries à raison de 1 l de vermiculite infectée par les bactéries pour 20 l de mélange. Le traitement a été effectué 5 j après la levée de la majorité des plantes. La concentration de 2,4-D utilisée, 100 mg/l. Un stock de 25 mg de 2,4-D a été dilué dans 10 ml d'éthanol à 70 % auquel il a été rajouté 0,5 g de tween 80, à ce mélange il a été rajouté de l'eau jusqu'à 1 l. Le traitement foliaire a été fait sous hotte chimique. Ensuite, les pots ont été déposés dans une chambre de croissance à 22 °C, avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité et ils ont été arrosés 2 fois par semaine avec 50 ml d'eau en ajoutant une fois par semaine un fertilisant 20-20-20. Après 40 j, le cycle de croissance a été changé en jours courts 12 h jour /12 h obscurité. Finalement, les tubercules de chaque traitement ont été récoltés et évalués pour leur résistance à la gale commune comme expliqué dans la section 2.7.4.

2.8.2. Test de résistance à la TA

Le test de résistance à la TA a été réalisé sur des tranches de tubercules de pomme de terre de Russet Burbank traités et non traités au 2,4-D. Les tubercules ont d'abord été lavés à l'eau et au savon. Puis ils ont été stérilisés dans une solution de 15 % de javel pendant 20 minutes et séchés sous la hotte à flux laminaire sur papier filtre stérilisé. À partir de ces tubercules, des tranches ont été coupées sous des conditions stériles et placées sur papier filtre imbibé d'eau stérile dans des boîtes de pétri. Des disques de papier filtre autoclavés, de 7 mm de diamètre, ont été trempés dans des solutions de différentes concentrations de TA, i.e. 0 à 10 μ M. Ces concentrations ont été obtenues par des séries de dilutions dans du méthanol (MeOH). Après séchage, ces disques ont été placés individuellement au centre de chaque tranche de tubercule. Puis une goutte d'eau stérile de 20 μ l a été déposée sur chaque disque. Les tranches ont été ensuite incubées à l'obscurité pendant 6 j et observées pour le développement de lésions nécrotiques. L'observation a été faite qualitativement en considérant les surfaces des taches brunes sur chaque tranche et en les comparant au témoin (0 μ M de TA, 100 % MeOH).

2.9. Analyse protéomique

Cette analyse a été effectuée pour évaluer les changements au niveau du protéome des tubercules provenant des plants habitués et aussi des plants traités au 2,4-D. Les tubercules à analyser ont été conservés à 4 °C. Pour chaque traitement, les protéines solubles ont été extraites de la chair (il s'agit de la partie charnue et comestible couverte par la peau) de trois tubercules. Pour ceci, une section à partir du centre des tubercules a été coupée en petits dés qui ont été ensuite broyés dans l'azote liquide avec un mortier et congelés à -80 °C jusqu'à utilisation. La poudre obtenue de la chair broyée a été homogénéisée dans un tampon d'extraction froid [0,1 M Tris-HCl (pH 8), 5 % (m/v) sucrose, 2 % (m/v) SDS et 0,5 % (m/v) d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Complete Ultra tablets, EDTA-free, Roche)] selon un ratio tampon : extrait de 3 : 1 et incubée pendant 15 min sur la glace. Les protéines solubles ont été récupérées par centrifugation à 20 000 g à 4 °C pendant 10 min. Ensuite, la concentration des extraits protéiques a été déterminée par dosage de type RC DC (BioRad). À partir de chaque extrait, 20 μ g ont été déposés sur gel SDS-PAGE 12 % (m/v), avec un

ratio de (37,5 :1) d'Acrylamide/Bis Acrylamide. Le voltage utilisé était de 200 V pour une durée de 1 h. Les gels ont été colorés au bleu de coomassie.

2.10. Méthodes sans marquage ou « label free »

Les échantillons de protéines extraites des différents tubercules matures de taille similaire (3 répétitions biologiques par traitement) ont été analysés au Centre de protéomique du CHUL à Québec pour la quantification par « Label Free ». Cette méthode sans marquage ou « label-free » est plus facile à mettre en œuvre sur des données à haute résolution tout en permettant d'obtenir une grande précision de masse sur les ions peptidiques. Les analyses ont été effectuées selon le protocole de Cox et Mann, (2008). Brièvement, les échantillons de protéines extraites dans un tampon (0.1 M Tris-HCl, 5 % sucrose, 2 % SDS) ont été précipitées par incubation dans l'acétone (5 fois le volume) pendant la nuit à -20 °C. Après centrifugation, le précipité a été remis en suspension dans un tampon de bicarbonate d'ammonium (50 mM) contenant 1 % de désoxycholate de sodium. Par la suite, 10 µg de protéine ont été chauffés à 95 °C pendant 5 min, mélangés avec du DTT (0.2 mM) et incubés dans l'iodoacétamide (0.8 mM) pendant 30 min à 37 °C. La digestion des protéines a été effectuée par incubation dans la Trypsine (1 :10, v : v) à 37 °C pendant la nuit. Les échantillons ont été ensuite acidifiés pour précipiter le désoxycholate de sodium et purifiés sur 'Stagetip'. Les extraits peptidiques secs ont été repris à 1 µg pour l'analyse en MS, 5 µL (=1 µg) d'extrait peptidique a été injecté. Les peptides obtenus sont analysés par nano LC-MS/MS : nanochromatographie Ultimate 3 000 RSLC (Dionex), couplée à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fabricant. Enfin, l'analyse bio-informatique des données obtenues a été effectuée au centre de protéomique du CHUL à Québec par MaxQuant/Andromeda en utilisant la banque de données Uniprot. La détermination des protéines variantes a été effectuée en utilisant le test de Welch (test de Student modifié) sur les 3 réplicas des 2 conditions à comparer, le calcul du Ratio B/A : Moyenne des 3 réplicas de B / Moyenne des 3 réplicas de A. Les résultats obtenus sous forme de fichier Excel de la part du centre de protéomique contenaient les peptides identifiés et quantifiés ainsi que les protéines auxquels ils appartiennent. À partir de ce fichier, les protéines dont l'abondance a changé significativement entre les échantillons analysés ont été regroupées. Ces protéines ont été classées selon leurs rôles et les voies

métaboliques dans lesquelles elles sont impliquées les données indiquées dans la base de données de Uniprot et aussi selon la littérature.

2.11. Extraction d'ARN et PCR quantitative

La qPCR a été utilisée pour valider les résultats de l'analyse protéomique. L'expression de quelques gènes a été évaluée pour vérifier le changement au niveau de l'abondance de certaines protéines. Trois tubercules matures de tailles similaires de chaque somaclone et du cultivar parent ont été utilisés pour les Yukon Gold. Trois tubercules provenant de plants traités et trois des non traités ont été utilisés dans le cas du traitement au 2,4-D. L'ARN total a été extrait de la poudre de chair de tubercules de pomme de terre congelée, comme décrit par Mohan Kumar *et al.*, (2007). La pureté et la concentration d'ARN ont été évaluées en mesurant l'absorbance à 230 nm, à 260 nm et à 280 nm en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop ND 1 000 (Thermo scientific).

Les amorces ont été conçues avec NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), les ensembles d'amorces correspondants ont été validés à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), (Tableau 2). La qualité des produits d'amplification de ces amorces a été vérifié sur gel. La transcription inverse a été réalisée en utilisant la transcriptase inverse (10 u/μl de Promega) à partir de 1 μg d'ARN. Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un volume réactionnel de 20 μL contenant 5 μl de Tampon 5x (Promega), 1,5 μl de transcriptase inverse (10 u/μl de Promega), 2,5 μl de dNTP (stock 10 mM), 2,5 μl de RNAsin (stock de 4 000 u/ μl de Promega) et 5 μl d'eau DEPC. La PCR quantitative a été utilisée pour étudier l'expression relative des différents gènes étudiés. La quantification a été effectuée par le système temps réel CFX96™ de BioRad. Pour réaliser l'amplification d'un gène donné le mélange de Biorad (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Vert) Supermix a été utilisé, le logiciel a été configuré pour effectuer 40 cycles. Chaque cycle comporte une première étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes, suivie d'une seconde dénaturation à 95°C pendant 15 secondes pour passer à l'étape d'hybridation de l'amorce à 55 ° C pendant 30 secondes.

Tableau 2. Amorces utilisées pour les tests de qPCR au cours du projet.

Gènes	Amorces (séquences 5' 3')
Ferritine F	CTG AAA TAA TGG CAG TTT CAG C
Ferritine R	CGA TGA AGT TTT CAA TGG AGT C
P23 tumor protein-like F	GGT GAG AGC ATG AGT GAC GA
P23 tumor protein-like R	TGA TCT CCT TCA AGC CAG GT
Lipoxygénase (Fragment) F	ACG AGC GGA CTA TTT GGT GG
Lipoxygénase (Fragment) R	GGA TTG CTG TGC TTC CCT TG
Glutathione S-transferase L3-like F	CTC AGC GAT GAC GCA CTT TG
Glutathione S-transferase L3-like R	TCG GGG TTT CGG TTA TTC GG

2.12. Quantification des métaux par ICP-MS

La quantification des métaux a été effectuée trois fois. À chaque fois la chair de trois tubercules matures de Yukon Gold Parent, YG8 et YG32 poussés en pots ont été utilisés. Pour cette expérience, un protocole modifié décrit par Darnajoux *et al.*, (2015) a été utilisé. Trois tubercules du cultivar parental Yukon Gold et des deux somaclones YG8 et YG32 ont été utilisés pour chaque test. Trois tests ont été effectués. La chair de tubercule a été broyée dans l'azote liquide pour obtenir une poudre fine. La poudre obtenue a été laissée à sécher dans une étuve à 70°C pendant 3 j. Une quantité de 250 mg de chaque échantillon broyé ont été transférés dans un tube en polypropylène auquel 2 ml d'acide nitrique ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été dilués 10 fois, enrichis avec un étalon interne (12 ppb Rh) et

analysés pour déterminer leurs concentrations de B, Mg, Al, P, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Fe, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sb, Ba, W, Tl et Pb. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse à plasma induit couplé Thermofisher XSeries II (ICP-MS) et du logiciel PlamaLab v2.6.1.335 (Barrette, 2017).

2.13. Mesure de la chlorophylle

Il a été rapporté dans la littérature qu'il y a une relation entre la teneur en fer et la chlorophylle. Afin d'évaluer ce paramètre dans notre cas, la teneur en chlorophylle des somaclones habitués a été comparée à celle du cultivar parent. Trois échantillons de plants (poussées en pots en chambre de croissance en jours long à 22°C le jour et 16°C la nuit avec une photopériode de 16 h jour) par somaclone ont été choisis au hasard. La mesure a été effectuée sur trois feuilles par plante à l'aide du chlorophylle-mètre SPAD-502 (Minolta). Cet appareil mesure instantanément la différence de la densité optique à deux longueurs d'onde (650 nm et 940 nm) sur une zone foliaire de 2 mm x 3 mm avec 2 lumières LED. Trois lectures de chlorophylle (valeurs SPAD) ont été effectuées à la surface centrale des feuilles, comme décrit par Cassol *et al.*, (2008). Les valeurs SPAD Obtenues sont des indices de la teneur en chlorophylle sur une échelle de 0 à 99.9 (sans unité).

2.14. Évaluation des changements au niveau du périderme

Les changements induits au niveau du périderme ont été vérifiés en microscopie (en collaboration avec mon collègue Marc Antoine Turcotte) et au niveau du développement de la bactérie et sa production en TA dans un milieu de culture contenant de la subérine de différentes origines.

2.14.1. Évaluation de l'épaisseur des couches cellulaires et de l'agencement des cellules

Pour l'analyse de l'épaisseur des couches du périderme, les tubercules de pommes de terre matures ont été coupés en fines tranches avec une lame de rasoir. L'autofluorescence de la

subérine dans la couche externe du périderme a été visualisée à l'aide de Zeiss ImagerZ1. Les images ont été prises en épifluorescence à l'aide d'un microscope Zeiss AxioImager Z1 muni d'une caméra Zeiss AxioCam MRm et contrôlé à l'aide du logiciel Zeiss Axiovision. Un filtre 365/100 nm a été utilisé pour l'excitation et un filtre 445/50 nm fut utilisé pour capter l'émission. Les sections ont été visualisées avec un objectif Zeiss 10X/0.45 NA Plan-Apochromat.

2.14.2. Évaluation des changements de la composition du périderme en subérine

Pour évaluer l'impact de la subérine sur la croissance bactérienne, le périderme de pomme de terre enrichi en subérine a été obtenu comme décrit par Kolattukudy et Agrawal, (1974). En bref, les tubercules de pomme de terre entiers ont été bouillis dans de l'eau pendant 20 min et la peau a été retirée. Après avoir soigneusement lavé les morceaux de peau avec de l'eau, ils ont été traités pendant une nuit avec une solution tampon à 50 mM d'acétate (pH 4,0) contenant des cellulases d'*Aspergillus niger* (5 g / l) et des pectinases de champignons (1 g / l) (Sigma). Les morceaux de peau ont été soigneusement lavés avec un mélange 2 :1 de chloroforme et de méthanol. Une extraction Soxhlet avec du chloroforme a été effectuée sur une période de 12 h. La matière extraite a été séchée sous la hotte, finement broyée à l'aide d'un moulin à café et conservée à température ambiante.

L'effet du milieu de croissance supplémenté en subérine sur le développement de la bactérie et la production de la TA a été déterminé à l'aide d'une méthode de Lerat *et al.*, (2010). Pour cette expérience, 10 µl de spores (10^8 spores) de *S. scabies* EF-35 ont été inoculés dans 25 ml de YME et incubées sous agitation (250 rpm) à 30 ° C pendant 48 h. Ensuite, les bactéries ont été centrifugées (10 min à $3\,500 \times g$) et remises en suspension dans 5 volumes de solution saline fraîche (0,85 % de NaCl). Ensuite, 100 µl de cette suspension ont été utilisés pour ensemercer des flacons contenant 50 ml de milieu à base d'amidon minimal, additionnés d'une subérine à 0,1 % (poids / volume).

L'effet du milieu de croissance supplémenté en subérine sur la production de biomasse et de thaxtomine A a été déterminé 6 j après l'inoculation. Les cultures bactériennes ont été centrifugées pendant 10 min à $3\,450 \times g$. Les surnageants ont été décantés et utilisés pour la

quantification de la thaxtomine A. Les pastilles (contenant les bactéries et de la subérine insoluble) ont été séchées pendant 24 h à 50°C et pesées. La croissance bactérienne a été déterminée après déduction du poids initial de la subérine. La purification et la quantification de la thaxtomine A dans les surnageants ont été effectuées selon Lerat *et al.*, (2010). Les molécules organiques ont été extraites à partir du surnageant avec de l'acétate d'éthyle, concentrées dans des tubes de 1,5 ml puis séchées par évaporation. Les molécules extraites ont été migrées par chromatographie sur couche mince en utilisant du chloroforme : méthanol (9 : 1). La thaxtomine A (Rf 0,27) a été éluée en utilisant un mélange chloroforme : méthanol (7 : 3) ensuite séchée et mise en suspension dans 1 ml d'acétonitrile. La TA a été quantifiée par chromatographie liquide comme décrit plus haut. Ce test a été effectué en collaboration avec Sylvain Lerat, assistant de recherche dans le laboratoire de la Pre. Carole Beaulieu.

2.15. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été choisies selon le nombre de traitements ou variables, le nombre de séries de données ou répétitions et la variances. Pour comparer la résistance des somaclones entre eux et par rapport au cultivar parent, le test One Way ANOVA ($p < 0,05$) a été utilisé pour déterminer les différences significatives au niveau de l'indice de gale commune, de la surface infectée et de la profondeur des lésions. Pour déterminer les protéines les plus abondantes issues de l'analyse protéomique, le test de Welch a été utilisé vu que la variance est supérieur à 2. D'autre part, le test de Student a été utilisé dans l'objectif 3 pour comparer les résultats du traitement au 2,4-D, qui est la seule variable dans ce cas, entre 2 groupes de données (traités vs non traités). Le test de contingence (Fisher exact test) a servi pour vérifier ou rejeter l'hypothèse qu'il y a une différence significative entre le nombre de tubercule ayant 6 % ou moins de surface infectée et ceux qui ont plus de 6 % d'infection. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad Prism 8.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1. Confirmation de la résistance des somaclones de Yukon Gold habitués à la TA et caractérisation

3.1.1. Évaluation de la résistance des somaclones de Yukon Gold habitués à la TA

Les somaclones du cultivar Yukon Gold ont été évalués pour leur résistance à la gale commune par une infection par *S. scabies*. Après la récolte, les tubercules du cultivar parental Yukon Gold (YGP) ainsi que ceux des somaclones YG8 et YG32 ont été évalués en notant les différents paramètres (surface infectée par la gale commune, profondeur des lésions et indice de gale) indiquant la sévérité des symptômes pour évaluer la résistance des somaclones à la gale commune comparés au cultivar parental. Les résultats préliminaires du premier test d'infection obtenu en 2014 ont montré que deux somaclones, YG8 et YG32 parmi sept testés étaient plus résistants ou tolérants à l'infection avec un indice de gale commune plus bas que les autres somaclones (3,1 et 2,3 chez YG8 et YG32) respectivement comparés à 4 chez le cultivar parental) (Tableau 3).

Ces deux somaclones et le cultivar parental utilisé comme témoin ont été sélectionnés pour les tests d'infection réalisés en 2015, en 2016 et en 2017. Selon les résultats présentés dans la Figure 6, YG8 et YG32 sont plus résistants à la gale commune comparés au parent.

Tableau 3. Évaluation des symptômes de la gale commune chez les tubercules des différents somaclones de Yukon Gold après une infection par *S. scabies* en pots, été 2014.

Somaclones	Nombre de tubercules	Poids moyen (g) des tubercules ¹	% Tubercules infectés	Indice de gale ^{1,2}	Profondeur moyenne (mm) des lésions ¹	% Tubercules vendables (% de surface infectée ≤ 6)
YGParent	18	3,71±0,79	94,4	4,0 ± 0,6	2,0±0,5	22,2
YG1	26	3,04±0,45	88,5	3,6 ± 0,4	2,1±0,4	11,5
YG2	20	2,57±0,55	95,0	4,4±0,4	2,2±0,3	5,0
YG4	23	4,48±0,76	95,6	4,1±0,4	3,8±0,4*	4,3
YG8	21	2,53±0,40	85,7	3,1±0,5	1,6±0,4	23,8
YG17	19	2,59±0,64	84,2	4,5±0,6	3,2±0,2*	21,0
YG18	18	2,09±0,43	94,4	5,6±0,5*	1,9±0,4	5,6
YG32	34	1,99±0,30	70,6	2,3±0,4*	0,9±0,3*	41,2

¹± erreur type; ² : indice moyen de la gale commune : 0 = aucun; 0,5 moins de 1 %; 1 = 1 à 5 %; 2 = 6 à 10 %; 3 = 11 à 35 %; 4 = 36 à 50 %; 5 = 51 à 75 %; 6 = 76 à 100 %. * : Différence statistiquement significative par rapport au cultivar d'origine ($p \leq 0,05$, Anova).

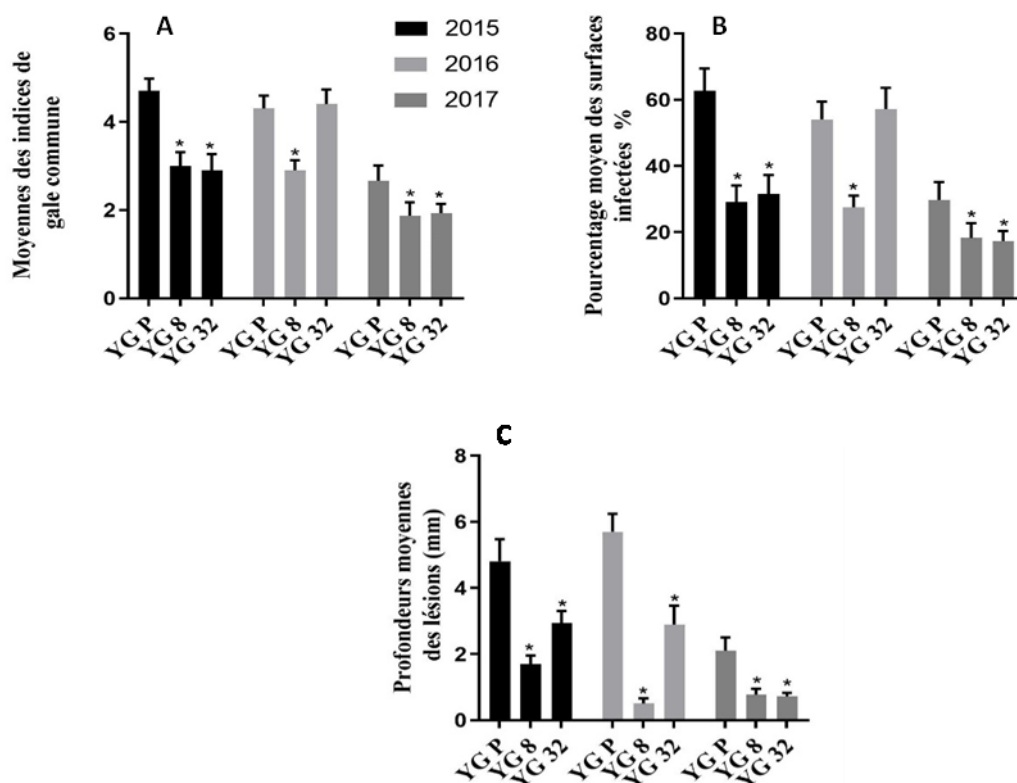


Figure 6. Évaluation de la résistance à la gale commune chez les somaclones YG8 et YG32 comparés au cultivar d'origine YGP suite à des infections par *S. scabies* dans les années 2015, 2016 et 2017. A) Moyenne des indices de gale commune \pm erreur type, (B) Pourcentage moyen des surfaces infectées \pm erreur type, (C) Profondeurs moyennes des lésions (mm) \pm erreur type. * valeurs significativement différentes comparées à YGP selon Anova ($p \leq 0,05$).

Plus précisément, l'indice de gale commune était significativement plus bas chez le somaclone YG32 par rapport au cultivar parental pour les essais de 2015 (2,9 contre 4,7) et 2017 (1,93 contre 2,66) contrairement à 2016 où l'indice de gale commune de YG32 était presque égal à celui de YGP. Un autre paramètre indiquait la sévérité de la maladie et la profondeur des lésions. Pour la profondeur des lésions, une diminution significative a été notée chez le somaclone YG32 par rapport au cultivar parent YGP pour les essais de 2014 (0,9 mm comparé à 2), 2015 (2,9 mm comparé à 4,8), 2016 (2,9 mm comparé à 5,6) et 2017 (0,72 mm comparé à 2,11). Les pourcentages de tubercules commercialisables ou vendables (les tubercules ayant une surface infectée de 6 % ou moins) étaient plus élevés pour le somaclone YG32 comparativement au YGP : de 19 % en 2014, de 22,1 % en 2015, de 0%

en 2016 et de 14,9 % en 2017 (Tableau 4 et Figure 6B). Pour le somaclone YG8, l'indice de gale commune a également diminué pour les essais de 2014 à 2017 (Figure 6A). Cette diminution était significative par rapport à YGP pour les essais de 2015 (3 comparé à 4,7) et de 2016 (2,8 comparé à 4,3) et 2017 (1,87 comparé à 2,66), ce qui correspond à une augmentation de 14, 16 et 19,6 % des tubercules vendables (Tableau 4). Les tubercules YG8 présentaient des lésions moins profondes par rapport à YGP pour les quatre essais et cette différence était significative pour les essais de 2015 (1,7 mm contre 4,8), 2016 (0,5 contre 5,6) et 2017 (0,77 contre 2,11). Pour l'année 2014, l'indice de la gale commune et la profondeur des lésions ont également diminué pour YG8, mais cette diminution n'était pas significative. Sur la base des résultats de ces tests, deux somaclones YG8 et YG32 ont été identifiés comme étant plus résistants à la gale commune. Ces somaclones ont été choisis pour des analyses plus approfondies afin de comprendre ce qui a pu augmenter leur résistance à la gale commune.

Tableau 4. Pourcentage de tubercules vendables (avec 6 % ou moins de surface infectée) chez les somaclones YG8 et YG32 et le cultivar parental (YGP) après infection par *S. scabies* pour les tests réalisés pour les années de 2014 à 2017.

	2014	2015	2016	2017
YGP	22,2	3,8	7,7	43,2
YG8	23,8	20,0 *	21,9	62,8
YG32	41,2	25,9 *	7,7	58,1

* : statistiquement différent par rapport au parent ($p < 0,05$, Fisher's exact test).

Selon les résultats obtenus depuis 2014, il a toujours été noté (sauf en 2016 pour YG32) un poids inférieur avec un plus grand nombre de tubercules produits à partir des somaclones YG8 et YG32 par rapport aux parents. Comme le montre le Tableau 3, un poids moyen plus

faible chez YG8 de 2,53 g et un nombre plus élevé de tubercules, 21 tubercules ont été notés. Les plantes de YG32 ont donné 34 tubercules avec un poids moyen de 1,99 g pour le même nombre de plantes comparativement à 18 tubercules et un poids moyen de 3,71 g chez le parent YG en 2014. Comme le montre la figure 7, ces changements se sont répétés pour les années 2015, 2016 et 2017, à l'exception du somaclone YG32 en 2016, où aucun changement significatif n'a été observé.

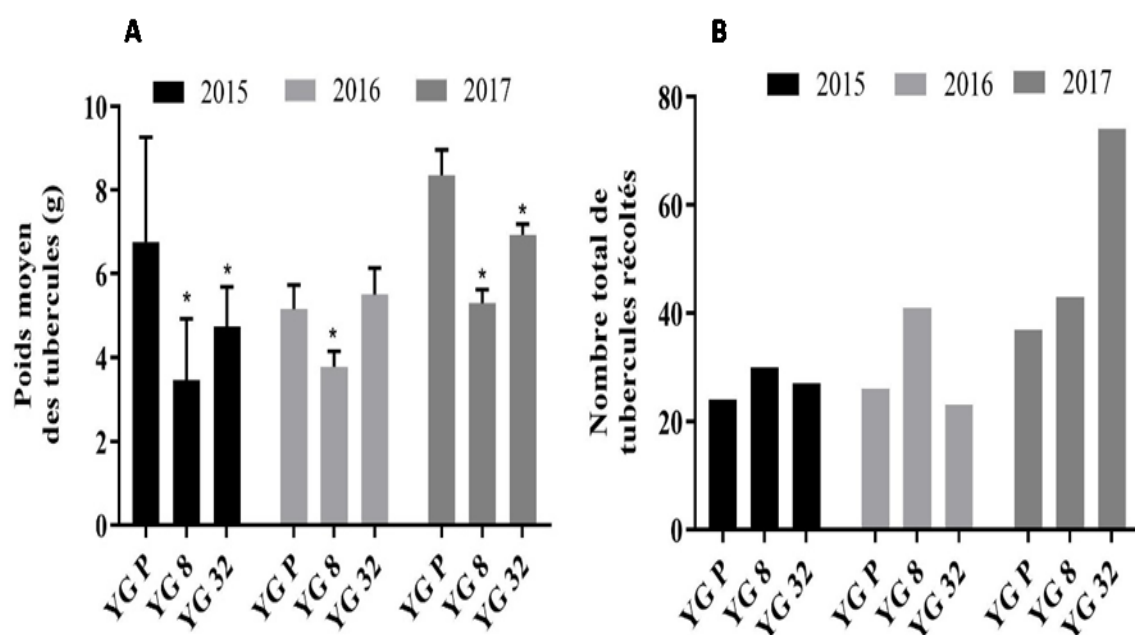


Figure 7. Comparaison entre le rendement de YG parent et les deux somaclones YG8 et YG32 pour les années 2015, 2016 et 2017. (A) Poids moyen des tubercules de Yukon Gold Parent (YGP) et des somaclones habitués à la thaxtomin A (YG8 et YG32). (B) Nombre total de tubercules récoltés chez YGP et les somaclones YG8 et YG32. Les barres d'erreur indiquent l'erreur type. *: Valeurs significativement différentes par rapport à YGP pour une même année ($p \leq 0,05$; Anova).

3.1.2. Caractérisation des somaclones YG8 et YG32

3.1.2.1. Analyses protéomiques

Les somaclones YG8 et YG32 ont été identifiés comme plus résistants à la gale commune. Pour analyser les changements au niveau des protéomes des somaclones résistants à la gale commune, une approche d'analyse protéomique comparative des protéines solubles des tubercules YG8, YG32 par rapport à celles de YGP a été utilisée. Des échantillons de protéines extraits de trois tubercules différents pour chacun des somaclone et pour le parent (YGPparent, YG8 et YG32) ont été envoyés au centre de protéomique du CHUL à Québec pour une quantification sans marquage qui permet d'avoir accès à la quantification absolue en intensité LFQ (Label Free Quantification) d'un très grand nombre de protéines simultanément. Les protéines dont l'abondance a augmenté significativement chez l'un des somaclones YG8 ou YG32 sont présentées en Annexe. En résumé 72 et 47 protéines sont devenues respectivement plus abondantes chez YG8 et YG32 deux fois ou plus comparé au parent YG (test de Welch, $p \leq 0,05$) (Tableau A et B, Annexe). Les protéines avec un changement d'abondance de deux fois ou plus comparé au parent YG (test de Welch, $p \leq 0,05$) chez les deux somaclones YG8 et YG32 ont été sélectionnées (Tableaux 5 et 6), les catégories fonctionnelles des protéines proviennent de la base de données Uniprot (*Gene ontology*) ou de ce qui a été rapporté dans la littérature. À partir de ces protéines dont l'abondance a été changée, 24 protéines ont été significativement plus abondantes simultanément chez YG8 et YG32 comparé à YGP. Parmi ces protéines, il a été noté que plusieurs sont connues pour leur implication dans différentes réponses aux stress et dans les réponses de défense (Ferritine, P23 tumor protein-like protein, protéine 14-3-3...) (Dellagi *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2007). La protéine la plus abondante chez les deux somaclones YG8 et YG32 est la ferritine qui est, respectivement, 11 et 19 fois plus abondante que chez le témoin. La ferritine est un chélateur de fer impliquée dans les réponses de défense (García Mata *et al.*, 2001).

Tableau 5. Protéines dont l'abondance était augmentée d'un facteur ≥ 2 à la fois chez les somaclones YG8 et YG32 par rapport au cultivar parent (YGP).

Identifiants Uniprot	Protéine	Ratio	Ratio	Catégorie fonctionnelle
		YG8/YGP	YG32/YGP	
Q9SWS0	Ferritine	11,24	19,02	Défense (García Mata et al., 2001)
Q3HVQ0	«P23 tumor protein-like protein»	11,03	19,02	Défense (Alfenas-Zerbini <i>et al.</i> , 2009)
Q6R2P7	Protéine14-3-3	6,84	6,96	Signalisation et expansion cellulaire/Défense (Oh., <i>et al.</i> , 2010; Roberts <i>et al.</i> , 2002)
Q38HU7	«RAD23-like»	6,65	5,66	Défense (Tocho <i>et al.</i> , 2012)
M0ZNB0	«l-ascorbate peroxidase cytosolic isoform X1»	6,60	2,90	Stress biotique et abiotique (Song <i>et al.</i> , 2005)
P93786	Protéine 14-3-3	5,61	5,42	Signalisation et expansion cellulaire/Stress biotique et abiotique
M1CNK1	«Triosephosphate isomerase cytosolic»	5,57	3,23	Stress biotique et abiotique (Sharma <i>et al.</i> , 2012)
M1C07	«Hsp90-2-like»	5,28	4,87	Stress biotique et abiotique (Nishizawa-Yokoi <i>et al.</i> , 2010)
M1AH14	Ferritine	4,93	8,71	Défense (García Mata et al., 2001)

Identifiants Uniprot	Protéine	Ratio	Ratio	Catégorie fonctionnelle
		YG8/YGP	YG32/YGP	
Q307Z8	«60S acidic ribosomal protein P0»	4,22	4,34	Stress biotique et abiotique (Semane <i>et al.</i> , 2010)
M1ALA6	«Elongation factor 1-delta 1-like»	4,17	2,23	Synthèse de protéines (Uniprot)
Q9LM03	Méthionine synthase	4,05	4,11	Stress biotique et abiotique (Luo et Levine, 2008)
P21342	«Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha»	4,00	2,69	Signalisation et expansion cellulaire (Guo <i>et al.</i> , 2012)
M1CTR3	Aconitate hydratase	3,81	3,18	Signalisation et expansion cellulaire (Terol <i>et al.</i> , 2010)
M1AWK7	«26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 homolog A»	3,57	2,89	Signalisation et expansion cellulaire (Coll-Martinez et Crosas, 2019)
Q2PYY8	Malate déshydrogénase	3,47	3,69	Stress biotique et abiotique (Wang <i>et al.</i> , 2016)
M1CTC4	«V-type proton ATPase catalytic subunit A»	3,43	2,73	Stress biotique et abiotique (Dietz <i>et al.</i> , 2001)
P43349	«Translationally-controlled tumor protein homolog»	3,13	3,45	Signalisation et expansion cellulaire (Wang <i>et al.</i> , 2017)
P93785	Protéine 14-3-3	3,12	2,53	Signalisation et expansion cellulaire/Défense

Identifiants Uniprot	Protéine	Ratio	Ratio	Catégorie fonctionnelle
		YG8/YGP	YG32/YGP	
M1BBH3	«Patellin-3-like»	3,28	2,39	Synthèse des protéines (Niczaj <i>et al.</i> , 2016)
M1A3D8	«Protein aspartic protease in guard cell 2»	2,97	3,88	Stress biotique et abiotique (Guo <i>et al.</i> , 2015)
M1CW15	«Glutathione reductase chloroplastic»	2,94	2,31	Stress biotique et abiotique (Wu <i>et al.</i> , 2015)
Q308A7	«Ripening regulated protein DDTFR10-like»	2,83	2,46	Synthèse des protéines (Uniprot)
M1A0W3	«Hsp70-Hsp90 organizing protein 2-like»	2,81	3,07	Stress biotique et abiotique (Sable <i>et al.</i> , 2018)
K7WNV9	«Thioredoxine H-type 2»	2,40	2,46	Stress oxydatif (Boubakri <i>et al.</i> , 2019)

Les protéines sont classées dans le tableau en fonction de l'abondance décroissante du somaclone YG8. Différence significative selon un test de Welch, ($p \leq 0,05$). L'identification des protéines provient des bases de données Uniprot et NCBI. Les identifiants des protéines sont ceux mentionnés comme étant identifiés suite à la quantification « Label free ». Les fonctions probables des protéines sont définies en se basant sur ce qui a été rapporté dans la littérature concernant ces protéines.

Les protéines les plus abondantes ont été classées selon leurs fonctions, ce qui a donné une idée des mécanismes qui pourraient être impliqués dans l'augmentation de la résistance (Figure 8).

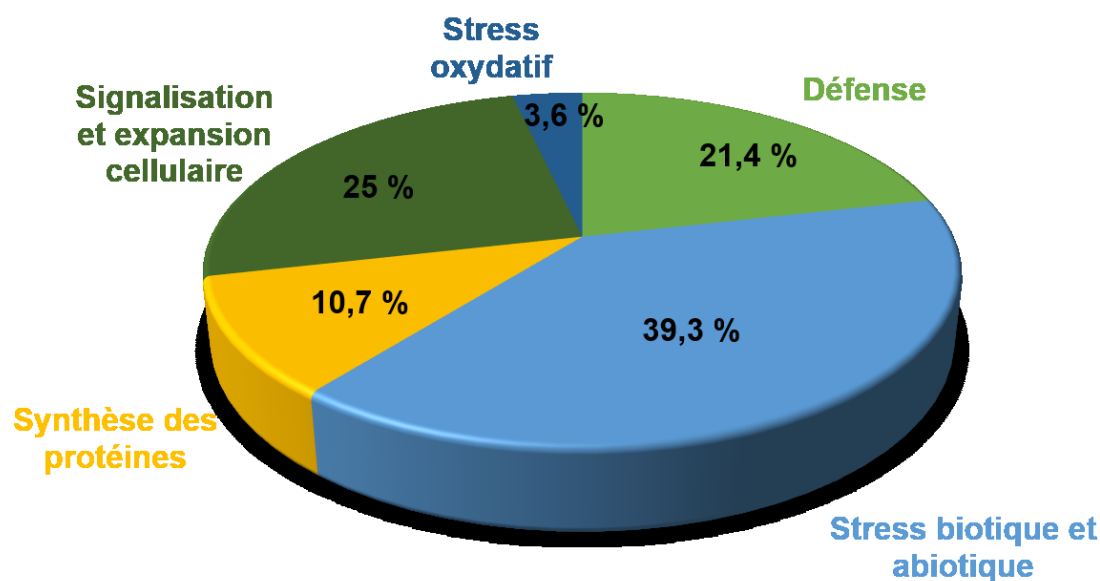


Figure 8. Classification fonctionnelle (d'après les catégories indiquées dans le Tableau 5) des protéines dont l'abondance est augmentée chez les deux somaclones YG8 et YG32 par rapport au cultivar parent. L'augmentation est d'un facteur ≥ 2 avec une différence significative selon un test de Welch ($p \leq 0,05$). Les chiffres indiqués sont des pourcentages sur un total de 24 protéines.

D'après les résultats présentés dans la Figure 8, on constate que la majorité des protéines (41,7 %) les plus abondantes après l'habituation sont impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. 12,5 % sont des protéines impliquées dans la réponse de défense, 16,7 % dans la signalisation et l'expansion cellulaire, 12,5 % dans la synthèse des protéines et 4,2 % dans la réponse au stress oxydatif. En ce qui concerne les protéines devenues moins abondantes chez les deux somaclones YG8 et YG32 plus résistants à la gale commune par rapport à YG, il a été noté respectivement 13 et 12 protéines devenues significativement (test de Welch, $p \leq 0,05$) moins abondantes chez YG8 et YG32 d'un facteur de deux ou plus comparé au parent YG (Tableau S1 et S2, Annexe). Parmi ces protéines, cinq étaient devenues moins abondantes dans les deux somaclones simultanément (Tableau 6).

Tableau 6. Protéines dont l'abondance est réduite d'un facteur ≥ 2 en commun dans les lignées YG8 et YG32 par rapport à la lignée parent YG (YGP).

Identifiants Uniprot	Protéine	Ratio	Ratio
		YG8/YGP	YG32/YGP
Q2MY56	Patatine group D-2	0,03	0,10
M1AAK6	Inconnue	0,11	0,29
M1CJ63	«ubiquitin-activating enzyme E1 2-like»	0,40	0,23
Q9M3H3	Annexine	0,41	0,26
K7WNY9	«Putative p23 co- chaperone»	0,42	0,23

Les protéines sont classées dans le tableau en fonction de l'abondance décroissante du somaclone YG8. Test de Welch ($p \leq 0,05$).

En conclusion, seulement cinq protéines dont la diminution en abondance est significative dans les 2 somaclones 8 et 32 en même temps ont été notées (Tableau 6). Parmi ces protéines, la protéine dont l'abondance a le plus diminué est la patatine du groupe D-2. Les patatines sont principalement des protéines de stockage (Bauw *et al.*, 2006). Selon ces résultats, il semble que le système de défense de la plante est activé aux détriments de ses ressources énergétiques.

Pour supporter les résultats de l'analyse protéomique, l'expression de certains gènes correspondant aux protéines les plus abondantes a été évaluée par qPCR. L'abondance des

transcrits d'ARNm de la ferritine et de la P23 tumor protein-like dans les tubercules des somaclones YG8 ou YG32 ainsi que du YGP a été vérifiée (Figure 9).

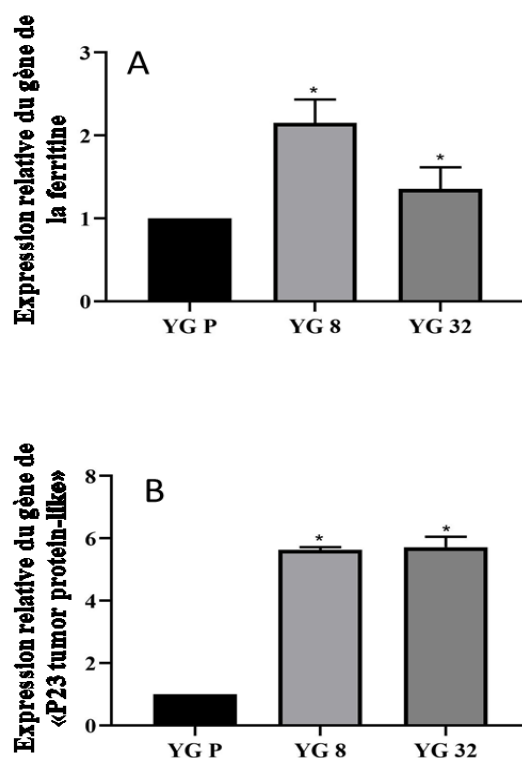


Figure 9. Expression relative des gènes de la ferritine (A) et de la « P23 tumor protein-like » (B) par rapport au parent et au gène de référence 18S, amplifiés par qPCR à partir de l'ARN extrait des tubercules de YG8 et YG32 somaclones par rapport à YGP. La valeur présentée est la moyenne de l'expression relative des gènes dans trois répliques biologiques par rapport au gène de référence 18S. Trois répliques techniques ont été utilisés pour chaque réplique biologique. Les barres d'erreur représentent l'erreur type. *: Valeurs significativement différentes par rapport à YGP selon Anova ($p \leq 0,05$).

L'augmentation de l'expression des gènes de la ferritine et de « P23 tumor protein-like » a été observée chez les somaclones YG8 et YG32 par rapport à YGP. Ces résultats ont appuyé les résultats obtenus suite aux analyses protéomiques puisque qu'il y avait aussi une variation de l'expression des gènes codants pour les protéines rendues plus abondantes chez les somaclones YG8 et YG32.

3.1.2.2. Quantification des métaux chez Yukon Gold et les somaclones YG8 et YG32

Selon la littérature, la disponibilité du fer et la production de la ferritine dans les plantes sont deux mécanismes liés, puisque la ferritine est principalement un chélateur de fer (Van Wuytswinkel *et al.*, 2002). On sait également que les nutriments essentiels influencent l'incidence ou la gravité de certaines maladies (Spann et Schumann, 2009). Dans notre cas, il a été intéressant de mesurer la quantité de fer dans la chair de tubercules des somaclones YG8 et YG32 à la suite de l'augmentation de la quantité de ferritine. Les changements dans l'abondance d'autres métaux (B, Mg, Al, P, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Fe, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sb, Ba, W) ont également été vérifiés. Une quantification de ces métaux dans les tubercules des somaclones YG8 et YG32 ainsi que dans les tubercules du cultivar d'origine a été effectuée. Une augmentation significative du fer, du magnésium, du zinc et du manganèse (augmentation significative seulement chez YG32) a été notée dans les tubercules des deux somaclones YG8 et YG32 simultanément (Figure 10). La teneur en fer a augmenté significativement de 70 et 118 % respectivement chez YG8 et YG32 par rapport à YGP. La teneur en magnésium a augmenté de 32 et de 57 % respectivement chez YG8 et YG32 par rapport à YGP. La teneur en zinc a augmenté de 75 et de 81 % respectivement chez YG8 et YG32 par rapport à YGP. Et la teneur en manganèse a augmenté de 42 et de 53 % respectivement chez YG8 et YG32 par rapport à YGP.

Une augmentation du taux du phosphore, du potassium et du cuivre chez les somaclones plus résistants à la gale commune a été notée mais cette variation n'est pas statistiquement significative (Figure S.1).

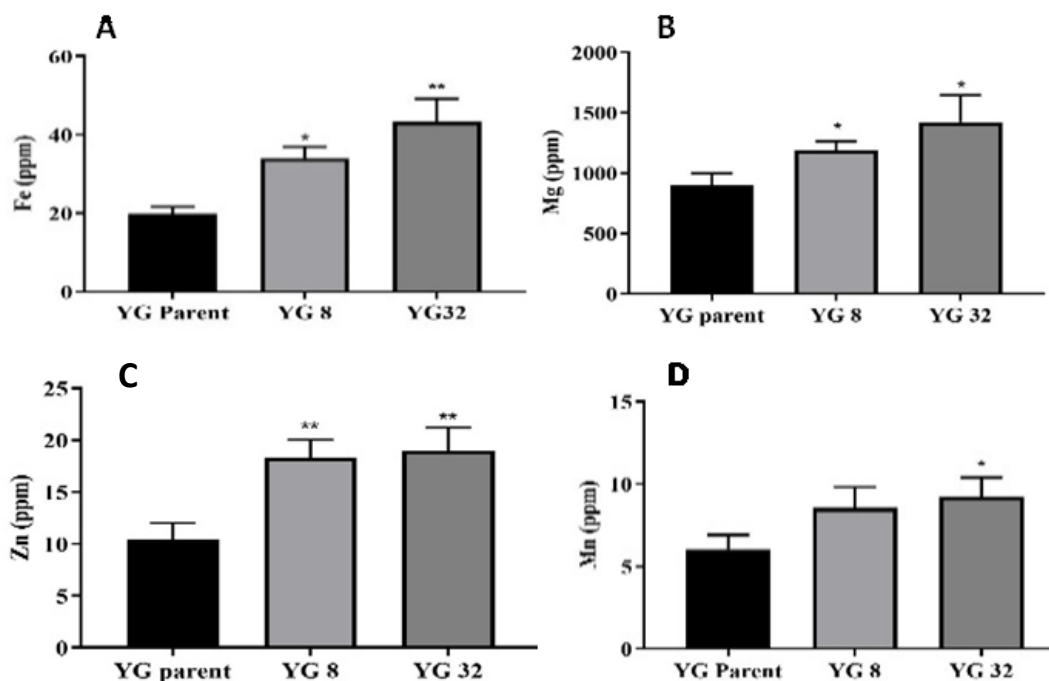


Figure 10. Quantification par ICP / MS du fer (A), du magnésium (B), du zinc (C) et du manganèse (D) dans neuf tubercules de YGP, YG8 et YG32 (moyenne de trois tests). Les barres d'erreur représentent l'erreur type. *: Valeurs significativement différentes par rapport à YGP selon Anova ($p \leq 0,05$). **: Valeurs significativement différentes par rapport à YGP selon Anova ($p \leq 0,0053$).

3.1.2.3. Quantification de la chlorophylle au niveau des feuilles de Yukon Gold et chez les somaclones YG8 et YG32

Il a été démontré que la surexpression de la ferritine dans le tabac était accompagnée de réponses physiologiques telle qu'une diminution de la concentration en chlorophylle, ceci est dû à la séquestration du fer par la Ferritine ce qui engendre une déficience physiologique en fer (Vansuyt *et al.*, 2003). L'analyse protéomique a montré une augmentation du taux de ferritine chez les somaclones YG8 et YG32. Ceci a mené à décider de vérifier si ce changement est aussi accompagné d'une modification au niveau de la teneur en chlorophylle en utilisant l'appareil de mesure de la chlorophylle SPAD-502 (Minolta). Les données de mesures fournies par le chlorophylle-mètre sont des indices (Valeurs SPAD, voir section matériel et méthodes) qui reflètent la teneur en chlorophylle de l'échantillon testé. Selon les

résultats présentés à la figure 11, il existe une diminution significative du niveau de la chlorophylle dans les feuilles du somaclone YG8 et encore plus importante dans les feuilles de YG32. Cette diminution significative corrèle avec le changement du taux de la Ferritine au niveau des tubercules, mais pour confirmer ces résultats il va falloir vérifier les changements de la teneur en fer et l'abondance de la Ferritine au niveau des feuilles.

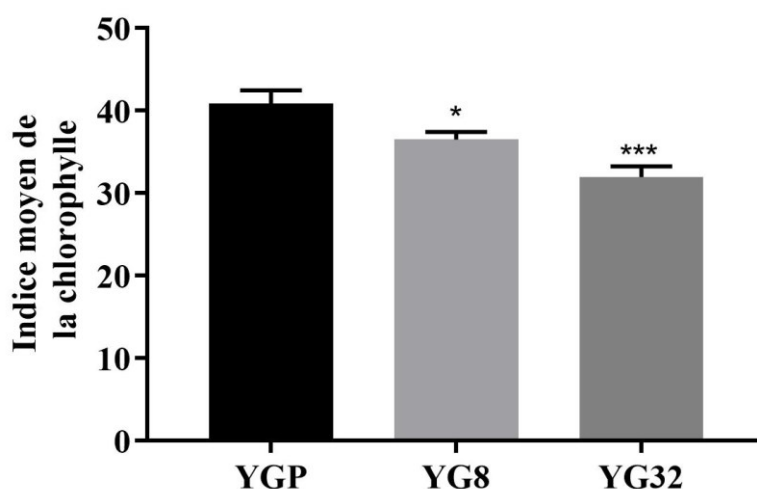


Figure 11. Mesure de l'indice moyen de la chlorophylle dans les feuilles de YGP, YG8 et YG32 avec un chlorophylle-mètre SPAD-502 (Minolta). Les barres d'erreur représentent l'erreur type. *: valeurs significativement différentes par rapport à celles obtenues chez YGP selon Anova. ($p \leq 0,05$). ***: Valeurs significativement différentes par rapport à celles obtenues chez YGP selon Anova. ($p \leq 0,0005$).

3.1.2.4. Changement au niveau du périderme des Yukon Gold

En considérant l'importance et l'implication du périderme dans la défense contre les attaques pathogènes, la microscopie à fluorescence a été utilisée pour vérifier les changements au niveau de l'épaisseur et la structure du périderme. Ceci est possible sans coloration puisque la subérine fluoresce naturellement sous le rayonnement Ultraviolet.

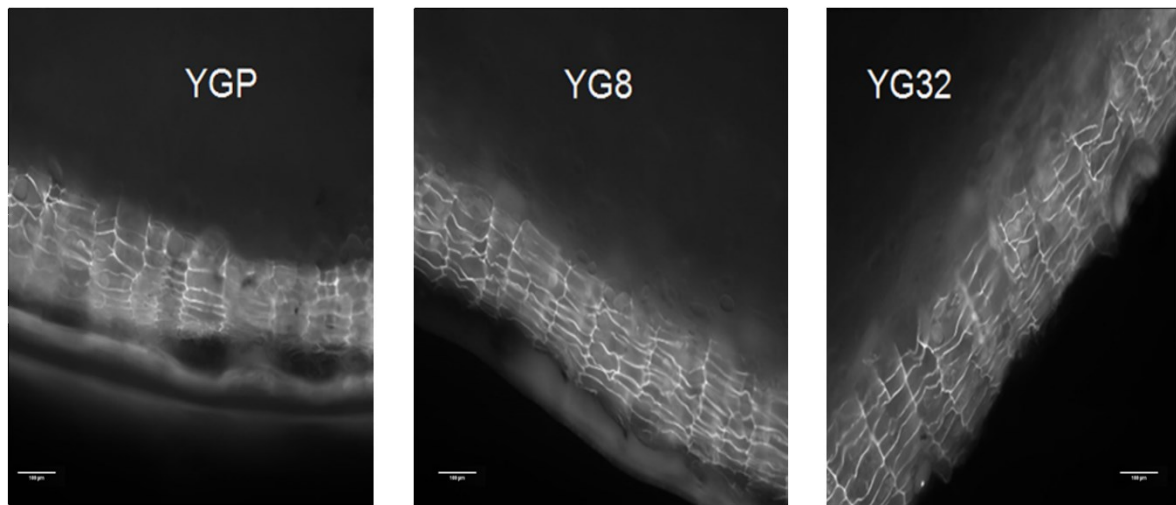


Figure 12. Visualisation de l'autofluorescence de la subérine au niveau du périodème des tubercules de YGP et les somaclones YG8 et YG32 habitués au TA en utilisant la microscopie à fluorescence.

Selon les résultats présentés dans la figure 12 et le Tableau 7, il a été constaté que l'habituement à la TA a provoqué des changements au niveau du périoderme des somaclones YG8 et YG32. Ces changements impliquent le nombre de couches et la structure des cellules de l'épiderme. On peut remarquer que visiblement il y a plus de couches cellulaires subérifiées au niveau du périoderme de YG8 et YG32 comparés à YGP. Pour chaque somaclone ainsi que pour YG parent, 12 photos (trois tubercules, deux tranches sur chaque tubercule et deux endroits différents sur chaque tranche) ont été traitées pour compter le nombre de couches cellulaires.

Après avoir constaté qu'il y a un changement au niveau de la forme et le nombre des couches cellulaires du périoderme chez les somaclones, l'effet de la subérine sur le développement de la bactérie et sa capacité à produire la TA a été vérifié (Tableau 8).

Tableau 7. Nombre de couches subérifiées du périoderme des tubercules de YGP, YG8 et YG32.

Cultivar / Somaclone	Nombre de couches subérifiées
YGP	6,95 ± 0,29
YG8	7,85 ± 0,15*
YG32	8,60 ± 0,19*

± : Erreur type. *: Différence statistiquement significative par rapport au cultivar d'origine (Anova. $P \leq 0,0001$). Trois tubercules ont été utilisés à chaque fois pour le cultivar parent ainsi que pour les deux somaclones.

Tableau 8. Production de TA par *S. scabies* en présence de subérine extraite des tubercules des somaclones YG8 et YG32 et du cultivar original YGP.

Origine de la subérine	Quantité de TA (µg/mg de bactéries)	Poids sec bactérien (mg)
YGP	23,1 ± 2,0	19,6 ± 1,3
YG8	5,2 ± 0,7*	16,9 ± 1,1
YG32	6,4 ± 0,8*	17,4 ± 0,9

± Erreur type; *: Différence statistiquement significative par rapport au cultivar d'origine (Anova. $P \leq 0,0001$). Cet essai a été effectué deux fois avec à chaque fois quatre tubercules différents de chaque somaclones et du parent.

Comme mentionné dans le Tableau 8, les changements au niveau du périoderme a probablement affecté la qualité de la subérine. L'origine de la subérine a provoqué un

changement dans la réponse de la bactérie qui a produit significativement moins de thaxtomine en présence de la subérine qui provient de tubercules de YG8 et YG32. La diminution de la production de la TA par *S. scabies* est de presque 70 % et de 75 % respectivement chez YG8 et YG 32 comparé à YG Parent.

Selon les résultats de la microscopie à fluorescence ainsi que la quantification de la TA produite par *S. scabies* en présence de la subérine provenant des tubercules des différents somaclones, il a été démontré que la résistance acquise par les somaclones est accompagnée par un changement au niveau des couches subérifiées du périderme. Ce dernier est devenu plus résistant à la pénétration de l'agent pathogène, de plus la subérine au niveau des cellules du périderme a subi des changements qui lui ont permis de réduire le pouvoir pathogène de la bactérie.

3.2. Habituation d'autres cultivars de pomme de terre à la TA

3.2.1. Régénération de somaclones à partir des cals habitués à la TA

Après avoir démontré que l'habituation des cals a permis d'obtenir des somaclones YG8 et YG32 significativement plus résistants à la gale commune que le cultivar parent Yukon Gold, il a été décidé de mettre au point cette même méthode chez de nouveaux cultivars. Tout au long de l'expérience, des cals habitués à différentes concentrations de TA ont été transférés sur milieu de régénération, une seule plantule a été régénérée à partir d'un seul cal (si le même cal régénère plusieurs plantules, une seule plantule est considérée comme nouveau somaclone). Chaque plantule régénérée a été multipliée et a représenté ainsi un nouveau somaclone. À partir des cals du cultivar Campagna (QP) sur milieu JayaSree, quatre cals ont été régénérés et 29 à partir des cals du cultivar Shepody sur milieu JayaSree8 (milieu Jaya auquel on a rajouté une faible concentration d'acide gibbérélique (GA) et d'auxine (NAA) et un régénérant pour chacun des autres cultivars (Tableau 9).

Tableau 9. Régénérants obtenus à partir de cals de différents cultivars habitués à la TA.

Cultivars	Campagna	Shepody	Roselys	Primevère	Exp.704.10
∑ régénérants	4	29	1	1	1
Concentration finale de TA	0,4 µM	0,5 µM	0,5 µM	0,5 µM	0,5 µM

La réponse des différents cultivars à la culture *in vitro* est très variable pour chaque étape, soit l'induction des cals, la régénération et l'enracinement. Ceci est influencé par plusieurs variables génétiques, physiologiques et environnementales. Ceci pourrait représenter une difficulté pour appliquer l'habituation à la TA chez certains cultivars, plusieurs mises au point devraient être faites.

3.2.2. Évaluation de la résistance des somaclones de Shepody habitués à la TA

3.2.2.1. Infection par bourgeons foliaires

Pour cette expérience, des bourgeons foliaires de cinq somaclones de Shepody parmi 29, régénérés à partir de cals habitués jusqu'à 0,5 µM, ont été infectés avec *S. scabies* en chambre de croissance pour tester leur résistance à la gale commune. Une diminution des symptômes de la gale commune a été notée chez quatre somaclones parmi les cinq testés, Shepody 20, 23, 24 et 25. Seuls Shepody 20 et 25 ont montré un changement du pourcentage de la surface infectée statistiquement significatif par rapport au parent (Figure 13, B) et au niveau de l'indice de gale commune (Figure 13, A). Les lésions étaient majoritairement superficielles ce qui a pas permis de comparer la profondeur des lésions entre les somaclones et le cultivar d'origine. Comme indiqué sur la figure 13, C le pourcentage de tubercules

infectés chez les somaclones n'est pas réduit comparé aux parents, il est même plus élevé chez Shepody 23 et 24.

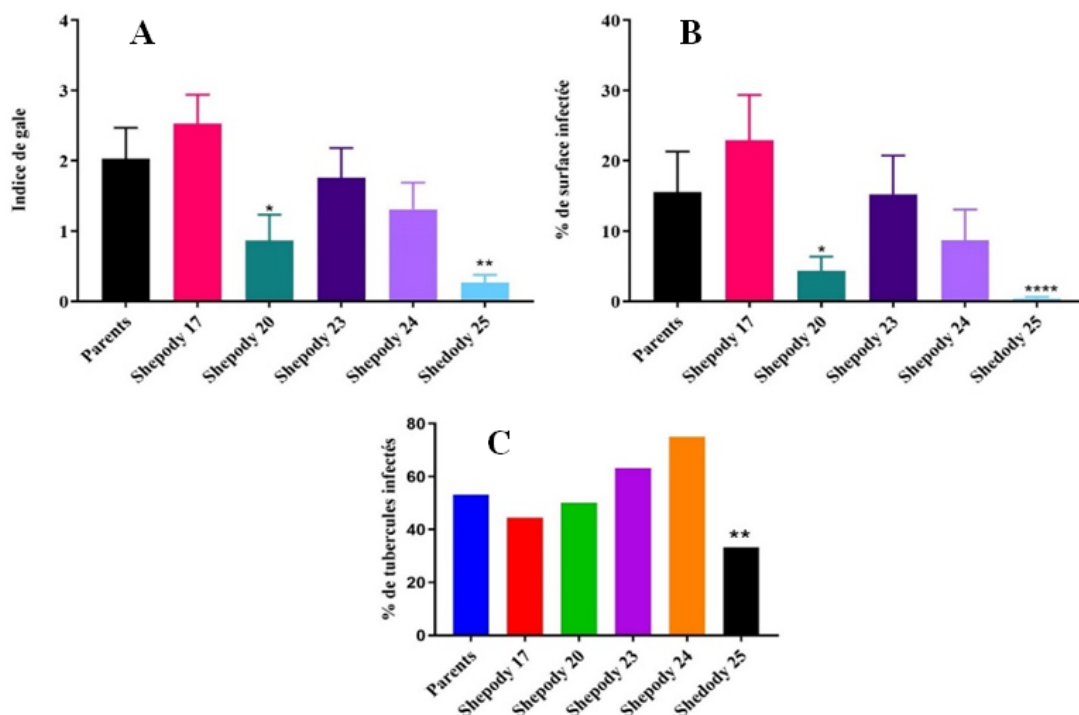


Figure 13. Évaluation de la résistance de somaclones de Shepody à la gale commune suite à une infection par *S. scabies* ; A. Indice moyen de gale commune \pm erreur type, B. Pourcentage moyen de la surface infectée \pm erreur type ; C. Pourcentage moyen des tubercules infectés ; chez des somaclones habitués à la TA et le cultivar parent Shepody. * significativement différent par rapport au parent ($p = 0,05$, test de Welch), ** significativement différent par rapport au parent ($p < 0,0001$, test de Welch), ** Significativement différent par rapport au parent ($p = 0,0078$, Fisher's exact test). Le nombre de tubercules évalués est indiqué dans le Tableau 10. Indice moyen de la gale commune : 0 = aucun; 0,5 moins de 1 %; 1 = 1 à 5 %; 2 = 6 à 10 %; 3 = 11 à 35 %; 4 = 36 à 50 %; 5 = 51 à 75 %; 6 = 76 à 100 %.**

Pour les somaclones 20, 23, 24 et 25, le pourcentage de tubercules ayant moins de 6 % de leur surface couverte de gale a augmenté approximativement de 20, 10, 30 et 50 % respectivement ce qui reste intéressant même si d'autres paramètres ne sont pas significativement changés pour certains de ces somaclones (Shepody 23 et 24) (Tableau 10).

Tableau 10. Nombre de tubercules récoltés et pourcentage de tubercules vendables chez les somaclones et le cultivar parent de Shepody.

Somaclones	Nombre de tubercules	% de tubercules ayant 6 % ou moins de surface infectée
Shepody Parent	15	53,4
Shepody 17	18	44,5
Shepody 20	12	75,0
Shepody 23	19	63,2
Shepody 24	16	81,3
Shepody 25	15	100,0*

* : statistiquement différent par rapport au parent ($p < 0,05$, Fisher's exact test).

3.2.2.2. Expériences en chambre de croissance

Une infection en pots a été effectuée en chambre de croissance, sur les 2 somaclones, Shepody 20 et 24. Les boutures du somaclone 25 n'ont pas été prêtes à être transférées en pot au moment de l'infection. Les somaclones 20 et 24 sont parmi ceux qui ont présenté les pourcentages les plus élevés de tubercules avec 6 % ou moins de surface infectée suite à l'infection par bourgeons foliaires (Tableau 10). Une diminution significative des symptômes a été notée pour les différents paramètres indiquant la sévérité de la maladie : la surface infectée, l'indice de gale commune et la profondeur des lésions. En ce qui concerne la surface infectée (Figure 14, A), une diminution significative avec une moyenne de 16,6 % et 6,9 % chez Shepody 20 et 24 respectivement comparés à 51,8 % pour les parents a été notée. L'indice de gale a aussi diminué significativement de 4,1 chez le cultivar parent à 2,0

chez Shepody 20 et à 1,3 chez Shepody 24 (Figure 14, B). Les lésions chez les somaclones 20 et 24 ont été clairement moins profondes avec des profondeurs moyennes respectives de 1,6 et de 1,3 mm comparés à une moyenne de 4,2 mm chez le cultivar parent (Figure 14, C).

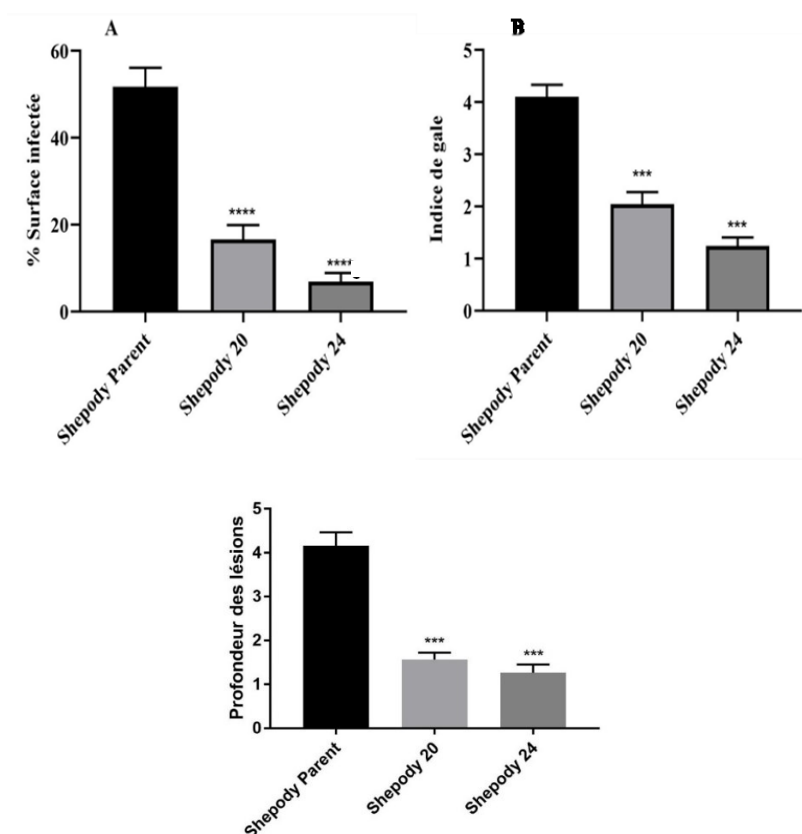


Figure 14. Évaluation de la résistance des somaclones Shepody 20 et 24 à la gale commune suite à une infection en pots par *S. scabies*. A. Pourcentage de surface infectée \pm erreur type, B. Indice de gale commune \pm erreur type, C. Profondeur moyenne des lésions (mm) \pm erreur type chez des somaclones habituées à la TA et le parent Shepody. Le nombre de tubercules est indiqué dans le tableau 7. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type. * significativement différent ($p \leq 0,05$, Anova).

La diminution de la sévérité des symptômes a impliqué une augmentation du pourcentage de tubercules vendables de 43 et de 67 % respectivement chez Shepody 20 et Shepody 24 (Tableau 11). Cette augmentation du nombre des tubercules vendables est un résultat très prometteur concernant l'amélioration de la résistance à la gale commune acquise chez Shepody qui est considéré comme un cultivar très sensible à la maladie.

D'autre part, les résultats de cet essai montrent que ces deux somaclones obtenus du cultivar Shepody ont produit un nombre de tubercules similaire à celui du Shepody parent. En effet le nombre de tubercules obtenus était de 35 et 37 chez Shepody 20 et Shepody 24, respectivement comparé à 37 chez Shepody Parent (Tableau 11). En plus, les tubercules de ces deux somaclones ont gardé un poids égal ou légèrement supérieur à celui des tubercules du cultivar parent (Figure 15).

Tableau 11. Nombre de tubercules récoltés et pourcentage de tubercules vendables chez les somaclones et le cultivar parent de Shepody.

Cultivar / Somaclone	Nombre de tubercules	Pourcentage de tubercules ayant moins de 6 % de symptômes de GC
Shepody parent	37	8,1
Shepody 20	35	51,4 *
Shepody 24	37	75,7 *

* : statistiquement différent par rapport au parent ($p < 0,0001$, Fisher's exact test).

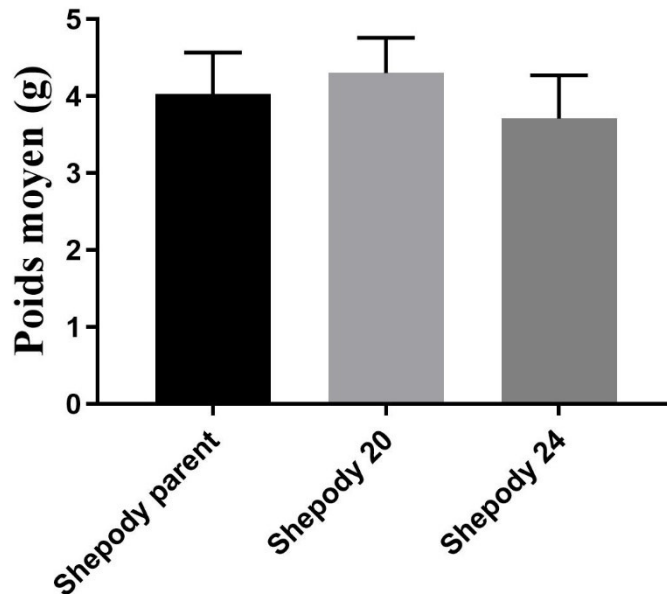


Figure 15. Poids moyen des tubercules récoltés des somaclones habitués à la TA et du cultivar parental Shepody. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type. Le nombre de tubercules est indiqué dans le tableau 11.

3.3. Objectif 3 : Évaluation de l'effet du traitement foliaire au 2,4-D

3.3.1. Effet du 2,4-D sur la gale commune

Le 2,4-D est un régulateur de croissance synthétique ayant une activité semblable à l'auxine, une hormone qui est impliquée dans beaucoup de processus de développement de la plante ainsi que dans la croissance cellulaire. De plus, il a été démontré que l'application foliaire de 2,4-D réduisait la gale commune de 45 % comparé aux témoins non traités (Thompson, 2013). Pour cette expérience on a voulu vérifier l'effet du traitement au 2,4-D pour protéger les pommes de terre contre la maladie de la gale commune. Effectivement, les tubercules de plantes infectées et traitées au 2,4-D ont montré des symptômes beaucoup moins sévères que les tubercules dont les plants n'ont pas été traités au 2,4-D (Figure 16). Plus précisément, le pourcentage de la surface infectée a clairement diminué de 35 % chez les plants non traités et à 7,5 % chez ceux traités au 2,4-D. L'indice de gale commune était également

significativement plus bas chez les tubercules infectés traités, soit 1,29 comparé à 3,26 chez les tubercules infectés non traités.

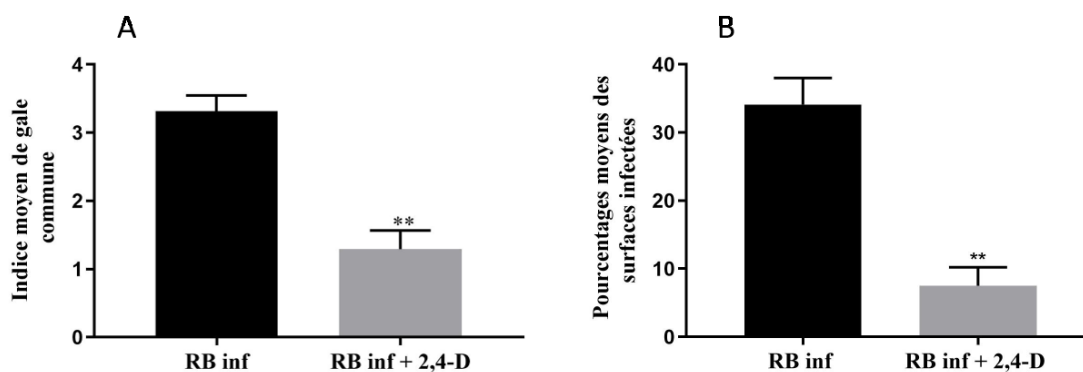


Figure 16. Évaluation de l'effet du traitement au 2,4-D sur la résistance à la gale commune chez Russet Burbank infectés par *S. scabies*. RB inf : Russet Burbank infectés ; RB inf +2,4-D : Russet Burbank infectés et traités au 2,4-D. A. Indice moyen de gale commune, B. Pourcentages moyens des surfaces infectées chez des tubercules de pomme de terre Russet Burbank traités ou non traités au 2,4-D en présence d'une infection par *S. scabies*. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-standard. ** : Variation statistiquement différente par rapport aux tubercules non-traités selon le Student test ($p \leq 0,0001$).

En conséquence, le pourcentage de tubercules vendables (tubercules ayant 6 % ou moins de surface infectée) a considérablement augmenté de 17 % chez les plantes infectées, à 75 % chez les plantes infectés et traités au 2,4-D. En plus, le traitement au 2,4-D n'a pas affecté les paramètres de rendement puisqu'aucune différence significative n'a été notée dans le poids des tubercules récoltés à la suite des différents traitements (figure 17).

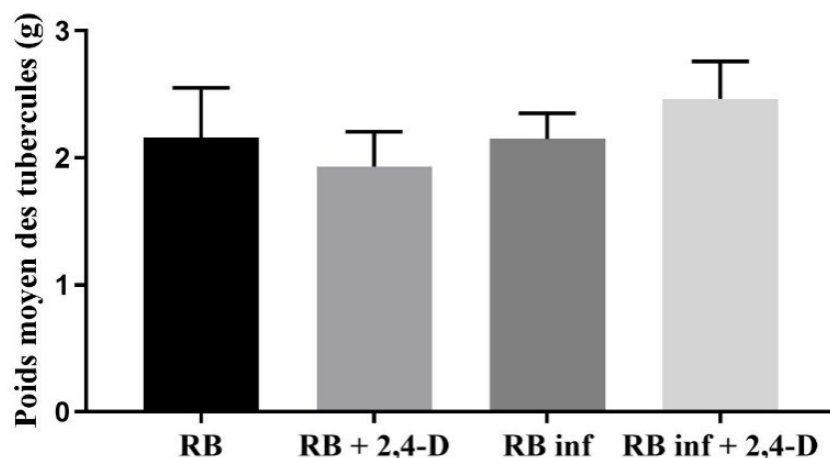


Figure 17. Poids moyens des tubercules de Russet Burbank récoltés suite aux différents traitements (témoins, témoins traités, infectés et infectés traités). RB : Russet Burbank, RB+2,4-D : Russet Burbank traités au 2,4-D, RB inf : Russet Burbank infectés ; RB inf +2,4-D : Russet Burbank infectés et traités au 2,4-D. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type. Différences statistiquement non significatives ($p \leq 0.05$, Anova).

3.3.2. Test de résistance à la TA des tubercules du cultivar Russet Burbank traités et non traités au 2,4-D.

Ce test a été effectué pour vérifier la corrélation entre la résistance acquise par le traitement au 2,4-D contre la gale commune et la résistance à la TA chez ces mêmes tubercules. Selon les résultats présentés dans la figure 18, la tranche qui provient d'un tubercule dont le plant n'a pas été traité au 2,4-D a des lésions causées par la TA qui sont plus sévères que celles observées sur la tranche qui provient d'un tubercule dont le plant a été traité au 2,4-D.

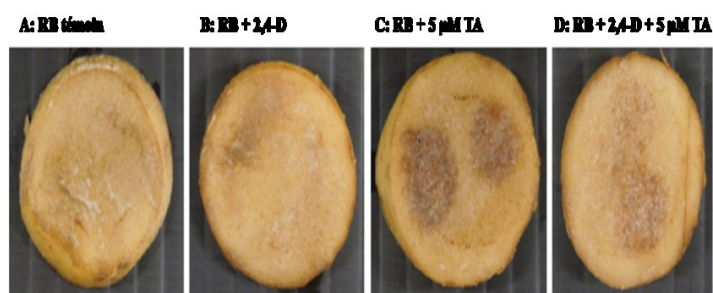


Figure 18. Photos de tranches de tubercules de Russet Burbank après trois jours de différents traitements (A : témoins ; B : témoins traités au 2,4-D ; C : témoins + 5 μ M de TA ; D : témoins traités au 2,4-D + 5 μ M de TA).

3.3.3. Analyse protéomique des tubercules du cultivar Russet Burbank traités et non traités au 2,4-D.

Après avoir confirmé que le traitement au 2,4-D augmente effectivement la résistance à la gale commune tel que démontré dans la littérature (Tegg *et al.*, 2008, 2011; Thompson *et al.*, 2013), une analyse protéomique comparative entre les tubercules de plantes traitées au 2,4-D et de plantes non traitées, a été effectuée pour cibler les mécanismes impliqués dans la résistance à la gale commune après le traitement. Selon les résultats présentés dans le Tableau 12, la majorité des protéines les plus abondantes après le traitement au 2,4-D sont impliquées dans les réponses de défense ou dans les réponses au stress biotique et abiotique. Quatre des huit protéines (50 %) les plus abondantes sont impliquées dans les réponses de défense et 2 protéines (25 %) sont impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. Selon ces résultats il a été démontré que le traitement au 2,4-D a induit des changements au niveau du protéome. Plusieurs protéines devenues plus abondantes suite au traitement au 2,4-D sont impliquées dans les réponses de stress et de défense tels que la lipoxigénase, ADP-ribosylation factor-like protein 8B, Glutathione S-transferase L3-like, 8-hydroxygeraniol dehydrogenase-like (Tableau 12).

Tableau 12. Protéines dont l'abondance est augmentée d'un facteur ≥ 2 chez les tubercules de Russet Burbank traitées au 2,4-D comparées aux non traitées.

Identifiant Uniprot	Protéine	Ratio RB+2,4 D/RB	Catégorie fonctionnelle
O24378	Lipoxygénase	5,49	Défense (Perla <i>et al.</i> , 2014).
M1BA07	«ADP-ribosylation factor-like protein 8B»	4,63	Stress biotiques et abiotiques (Gupta <i>et al.</i> , 2019)
M1ARK1	«Glutathione S-transferase L3-like protein»	3,94	Défense (Wang <i>et al.</i> , 2019)
M1BBJ3	«8-hydroxygeraniol dehydrogenase-like protein»	3,65	Défense (Sundaresha <i>et al.</i> , 2018).
M1ASL9	«COP9 signalosome complex subunit 6a-like» protein»	2,90	Métabolisme des Protéines (Franciosi <i>et al.</i> , 2015)
M1ACI8	«Early nodulin-93»	2,81	Stress biotiques et abiotiques (Zogli et Libault, 2017)
M1CN57	«Probable glutathione S-transferase»	2,57	Défense (Wang <i>et al.</i> , 2019)
M0ZLV0	«Protein CREG1»	2,35	Signalisation et expansion cellulaire (Ghobrial <i>et al.</i> , 2018)

Test de Welch, $p \leq 0,05$. Les protéines de trois tubercules différents ont été analysées pour chaque somaclone et pour le parent. Les protéines sont classées dans le tableau en fonction de l'augmentation de l'abondance descendante.

Pour appuyer les résultats de l'analyse protéomique, l'expression de certains gènes correspondant aux protéines les plus abondantes a été évaluée par qPCR. L'abondance des

gènes de la lipoxigénase et de la Glutathione S-transferase L3-like dans les tubercules de Russet Burbank et Russet Burbank traitées au 2,4-D a été vérifiée (Figure 19).

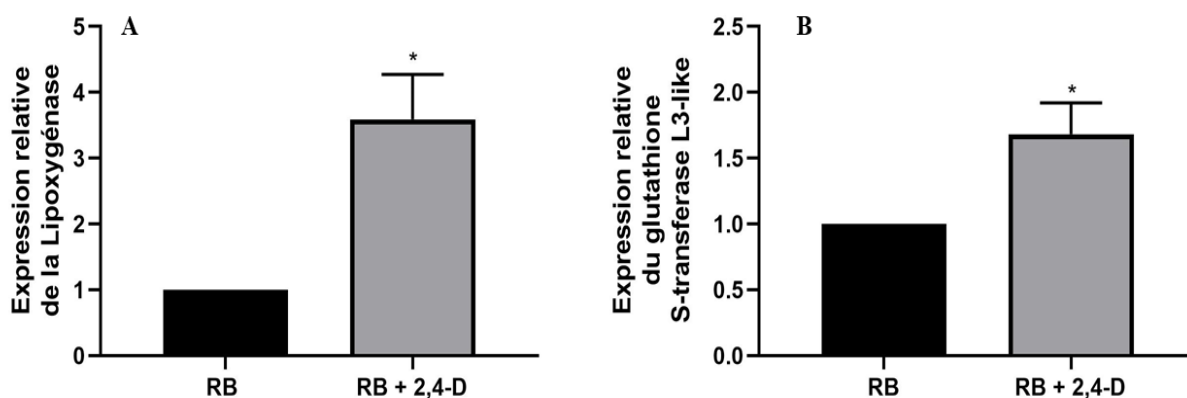


Figure 19. Expression relative des gènes de la lipoxigénase (A) et de « Glutathione S-transferase L3-like (B) chez RB traités par rapport à RB témoin et par rapport au gène de référence 18S amplifiés par qPCR à partir de l'ARN extrait des tubercules de RB et RB traités au 2,4-D, trois réplicas biologiques. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type. *: valeurs significativement différentes selon le test de Student ($p \leq 0,0001$).

L'augmentation de l'expression des gènes de la lipoxigénase et de Glutathione S-transferase L3-like a été observée chez les RB traités par rapport aux RB non traités au 2,4-D. Ceci démontre qu'il y a eu un changement au niveau de l'expression des gènes responsables de l'abondance de ces protéines, la lipoxigénase et la Glutathione S-transferase L3-like. Ces résultats corréleront avec les résultats de l'analyse protéomique.

3.3.4. Changements au niveau du périderme

Le but de cette expérience était de vérifier l'effet du traitement au 2,4-D sur le périderme du tubercule. Ces changements ont été vérifiés en microscopie à fluorescence et en termes de développement de la bactérie et sa production en TA dans un milieu de culture contenant de la subérine de différentes origines. Pour cet expérience la subérine a été extraite des tubercules de plants traités et de plants non traités au 2,4-D (Voir section matériel et méthodes). Comme le montre la figure 20, il n'est pas très clair s'il y'a une différence

concernant le nombre de couches subérifiées entre RB témoin et RB traités. Le nombre de couches des cellules subérifiées, l'aire de ces cellules ainsi que la régularité de la forme des cellules ont été évalués par le logiciel imageJ (Caraza-Harter et Endelman, 2019). Comme présenté dans le Tableau 13, moins de couches cellulaires ont été notées chez les tubercules de RB dont les plants ont été traités au 2,4-D comparé au non traités. Par contre, l'aire des cellules subérifiées a été significativement plus élevée chez les tubercules dont les plants ont été traités au 2,4-D et que ces cellules ont été significativement plus déformées (plus la valeur est petite plus la cellule est déformée).

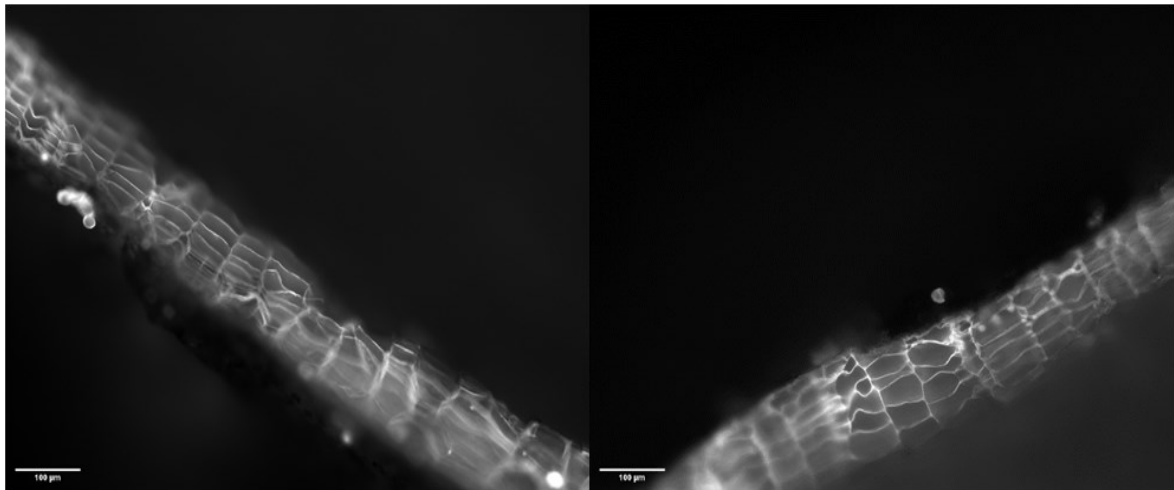


Figure 20. Visualisation de l'autofluorescence de la subérine au niveau du péricorme des tubercules de RB et RB traités au 2,4-D (trois tubercules pour chaque traitement, deux tranches par tubercule, deux endroits différents sur la même tranche ont été considérés dans cette expérience).

Tableau 13. Évaluation du nombre et de la forme des couches subérifiées au niveau du périderme de la partie basale des tubercules de RB témoin et RB traité au 2,4-D.

Traitement	Nombre de couches subérifiées	Aires des cellules subérifiées (μm^2)	Régularité de la forme des cellules
RB témoin	6,22 \pm 0,38 (n = 18)	658,5 \pm 22,92 (n = 90)	0,778 \pm 0,01 (n = 90)
RB + 2,4-D	5,07 \pm 0,21* (n = 15)	761,1 \pm 23,75** (n = 90)	0,695 \pm 0,01*** (n = 90)

\pm : Erreur type. *: valeurs significativement différentes selon le test de Student ($p \leq 0,05$). **: valeurs significativement différentes selon le test de Student ($p \leq 0,01$). *** : valeurs significativement différentes selon le test de Student ($p \leq 0,0001$). Trois tubercules différents ont été utilisés pour chaque traitement.

L'effet de la différence de l'origine de la subérine utilisé dans le milieu de culture des bactéries a été évalué. Comme le montrent les résultats du tableau 14, le développement de *S. scabies* a été significativement affecté par la différence de l'origine de la subérine ajoutée au milieu de culture (extraite des tubercules de plants traités ou non traités au 2,4-D). Il y a eu également une inhibition significative de la production de thaxtomine A par *S. scabies* lorsque la subérine provenait de tubercules de Russet Burbank traités au 2,4-D.

Pour conclure, le traitement au 2,4-D ou l'habitation à la TA ont augmenté la résistance à *S. scabies* et à l'expression des symptômes. Cette résistance est accompagnée dans les deux essais par un changement au niveau du périderme. Ce changement semble être différent ou spécifique à chaque traitement inducteur. Dans le cas des somaclones résistants à la gale commune l'effet du changement au niveau du périderme a affecté seulement la pathogénicité de la bactérie. Par contre le traitement au 2,4-D a provoqué un changement au niveau du périderme et de la subérine qui a affecté la pathogénicité de la bactérie (la production de la TA) mais aussi la croissance de la bactérie.

Tableau 14. Croissance de *S. scabies* et sa production de TA en présence de subérine extraite des tubercules de Russet Burbank témoins et traités au 2,4-D.

Origine de la subérine	Croissance (mg bactéries/mL)	Thaxtomine A (µg / mg de bactéries)
RB témoins	1,85 ± 0,04	38,3 ± 3,6
RB + 2,4-D	1,18 ± 0,05	7,1 ± 1,7
Valeur de <i>P</i>	<0.0001	<0.0001

± : Erreur type. Quatre répétitions biologiques ont été utilisées pour ce test.

Pour conclure, le traitement au 2,4-D ou l'habituación à la TA ont augmenté la résistance à la gale commune cette résistance est accompagnée dans les deux cas par un changement au niveau du périoderme mais ce changement semble être différent.

CHAPITRE 4

Discussion générale et conclusions

4.1. Objectif 1: Confirmation et caractérisation de la résistance des somaclones de Yukon Gold habitués à la TA

Dans ce projet, l'hypothèse selon laquelle l'habituation des cals de pomme de terre à la TA, la toxine responsable de la pathogénicité de *S. scabies*, permettrait de produire des somaclones plus résistants à la gale commune a été testée. La TA a été utilisée compte tenu de son importance dans la maladie, mais également en s'appuyant sur divers travaux de recherche antérieurs. La méthode de l'habituation a permis de régénérer de nouveaux somaclones à partir du cultivar Yukon Gold testé pour leur résistance à la gale commune par infection par *S. scabies*. Les premiers tests ont permis de sélectionner deux somaclones YG8 et YG32 qui ont montré une résistance plus élevée à la gale commune comparé aux autres somaclones et au cultivar parent. Le premier objectif a consisté à confirmer la résistance de ces somaclones et de les caractériser pour cibler les changements qui ont accompagné l'acquisition de cette résistance.

4.1.1. Confirmation de la résistance des somaclones YG8 et YG32

Pour confirmer la résistance des somaclones YG8 et YG32 des infections en pots en chambre de croissance et en serre sur quatre années successives ont été effectués. Les résultats de nos tests d'infection avec *S. scabies* ont montré que les deux somaclones YG8 et YG32 sont plus résistants que les parents à la gale commune. Ceci a été déduit suite à une diminution significative au niveau des paramètres de l'incidence et de la sévérité de la maladie chez ces deux somaclones (Figure 6). Cette diminution a augmenté le nombre de tubercules ayant 6 % ou moins de surface infectée qui est un pourcentage considéré comme acceptable sur le marché (Tableau 4). De plus l'évaluation a été faite sur quatre années successives et la résistance acquise a été maintenue au fil des années. Il a donc été conclu que ces deux somaclones ont acquis une résistance à la gale commune suite à l'habituation à la TA. En

outre, des recherches antérieures menées dans notre laboratoire ont montré que les cellules de peuplier habituées à la TA restaient résistantes à la toxine après plusieurs cycles de division, même en l'absence de TA (Brochu *et al.*, 2010). Dans ce même contexte, il a été démontré que des régénérants tolérants au stress peuvent être obtenus en exposant des cals de plantes à des agents de sélection tels que NaCl (pour la tolérance au sel) ou le mannitol (pour la tolérance à la sécheresse), à une phytotoxine ou à un agent pathogène (Rai *et al.*, 2011). Les tubercules obtenus de nos somaclones YG8 et YG32 sont plus petits que ceux obtenus du parent. Mais un nombre de tubercules plus élevé a été généralement obtenu chez les somaclones résistants. Ceci pourrait être dû à l'activation du système de défense chez la plante qui aurait provoqué un épuisement de ses ressources énergétiques. Il a déjà été démontré que l'augmentation de la résistance pourrait être un facteur limitant pour la croissance et pour le rendement dans de nombreux cas (Brown, 2002).

Pour la continuité du projet, des essais au champs seraient intéressants pour pouvoir évaluer l'effet de cette résistance sur le rendement et d'autres paramètres agronomiques. Faire des essais sur plusieurs générations des somaclones résistants mènera aussi à confirmer que l'habituation permet de produire de nouveaux cultivars résistants et qui gardent leur résistance au fil des générations. Ceci a été confirmé chez Russet Burbank un autre cultivar habitué à la TA dans notre laboratoire.

4.1.2. Caractérisation des somaclones YG8 et YG32

Afin de comprendre les voies impliquées dans l'acquisition de cette résistance, une analyse protéomique, une quantification des métaux et une évaluation des changements au niveau du périoderme ont été effectuées sur les somaclones YG8 et YG32.

4.1.2.1. Analyse protéomique

Les modifications protéomiques peuvent permettre de mieux comprendre les points critiques des voies liées à la défense qui pourraient être manipulées pour améliorer la résistance de la plante aux attaques pathogènes. Dans notre cas, les résultats de l'analyse protéomique ont montré que 25 protéines ont été significativement plus abondantes en même temps chez les somaclones YG8 et YG32 que chez le parent YGP. La classification a montré que 41,7 %

de ces protéines sont impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques, 12,5 % dans les réponses de défense, 4,2 % dans les voies de stress oxydatif, 12,5 % en synthèse des protéines et 16,7 % en signalisation et expansion cellulaire. Ces résultats ont démontré que la résistance acquise par les somaclones est associée à des changements au niveau du protéome. Ces changements semblent impliquer des réponses aux stress et de défense. Par ailleurs, la ferritine qui est un chélateur de fer était la protéine la plus abondante chez les deux somaclones, avec une augmentation, respectivement, de 11 et 19 fois chez YG8 et YG32 par rapport à YGP (Tableau 5). Il a été démontré que la ferritine est impliquée dans la réponse de défense de la plante contre l'attaque pathogène de *Phytophthora infestans* qui cause le mildiou chez la pomme de terre. Il a aussi été démontré que l'utilisation de la déféroxamine, agent chélateur du fer exogène a permis de diminuer l'incidence du mildiou (García Mata *et al.*, 2001). Il a également été démontré que l'accumulation de la ferritine constituait un mécanisme de défense basal activé par des sidérophores bactériens au cours d'une infection par *Erwinia chrysanthemi* chez *Arabidopsis thaliana* (Dellagi *et al.*, 2005). Dans le tabac, il a été noté que la ferritine protège des dommages dus à l'oxydation et aux attaques pathogènes (Deák *et al.*, 1999). Il est alors très probable que ce changement au niveau de l'abondance de la ferritine est un facteur principal contribuant à la résistance des somaclones YG8 et YG32 à la gale commune.

Une autre protéine qui peut être impliquée dans l'acquisition de cette résistance, est la « P23 Tumor protein-like protein ». C'est la deuxième protéine dont l'abondance a augmenté chez YG8 et YG32, avec une augmentation de 11 et 19 fois respectivement par rapport au parent (Tableau 5). Cette protéine appartient à la famille des protéines tumorales contrôlée par la traduction (TCTP) (Yan *et al.*, 2000). Des études ont révélé des changements dans la transcription des TCTP ou dans le niveau de protéines TCTP chez les plantes en réponse à différents stress (Ermolayev *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2007). Par exemple, chez la tomate une augmentation de l'expression du gène de la protéine de type P23 a été notée dans l'interaction avec le virus de la mosaïque jaune (PepYMV) (Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009).

D'autre part, chez les somaclones qui ont développé une résistance à la gale commune, certains membres de la famille de protéines des 14-3-3 sont devenues plus abondants. Les protéines 14-3-3 sont une famille de protéines ayant un rôle général dans la transduction du

signal (Lozano-Durán and Robatzek, 2015). Elles agissent principalement en tant que phosphosenseurs. Étant donné que la phosphorylation est impliquée dans différentes réponses physiologiques chez les plantes, les protéines 14-3-3 jouent un rôle dans plusieurs voies de signalisation (Lozano-Durán et Robatzek, 2015). Selon plusieurs revues ces protéines sont impliquées dans les réponses au stress biotiques et abiotiques et jouent un rôle crucial dans l'immunité de la plante (Lozano-Durán et Robatzek, 2015; Oh, 2010; Roberts *et al.*, 2002). Il a été démontré que chez la tomate une protéine 14-3-3 régule positivement la mort cellulaire programmée associée à la réponse à *Pseudomonas syringae* en augmentant l'abondance et la capacité de signalisation des protéines MAPKKK α (Oh *et al.*, 2010). Encore chez *Arabidopsis*, la surexpression d'un isoforme du gène 14-3-3 s'est traduite par une mort cellulaire hypersensible ressemblant à une résistance accrue en réponse à la maladie de l'oïdium (Yang *et al.*, 2009). Dans une étude ultérieure, la méthode de chimioluminescence a été utilisée pour montrer l'impact des protéines 14-3-3 sur l'activité antioxydante chez les plants de pomme de terre (Łukaszewicz *et al.*, 2002). L'analyse de l'épiderme du tubercule chez des plants transgéniques présentant une surexpression de protéines 14-3-3 a révélé une activité antioxydante supérieure de 45 % à celle des plants témoins. L'effet inverse a été observé chez des plantes transgéniques ayant les protéines 14-3-3 réprimées (Łukaszewicz *et al.*, 2002). Les modifications au niveau de l'abondance de certaines protéines observées chez les somaclones ont été consolidées par qPCR. L'expression relative des gènes qui codent pour les protéines « P23 tumor protein-like » et la ferritine était augmentée chez YG8 et YG32 comparés au parent YGP. Ceci appuie nos résultats de l'analyse protéomique.

Comme perspectives, il faudrait pousser plus les recherches concernant les protéines dont l'abondance a beaucoup augmenté chez les somaclones YG8 et 32, les comparer aux protéines dont l'abondance a augmenté chez les somaclones d'un autre cultivar habitué à la TA tels que Russet Burbank et essayer de trouver le lien entre ces protéines. De cette manière il serait probablement possible de mieux cerner les voies de défense à la gale commune.

4.1.2.2. Quantification des métaux et teneur en chlorophylle

Des concentrations adéquates de métaux essentiels sont nécessaires non seulement à la croissance et au développement de la plante et des agents pathogènes, mais également à la virulence de ces agents pathogènes et aux défenses des plantes (Poschenrieder *et al.*, 2006). Dans le cas de notre projet, la quantification des métaux a été faite principalement pour vérifier la teneur en fer chez les somaclones suite à l'augmentation de l'abondance de la protéine de la ferritine. La disponibilité du fer et la production de la ferritine dans les plantes sont deux mécanismes étroitement liés (Van Wuytswinkel *et al.*, 2002). La ferritine a été définie comme la principale protéine de stockage du fer, elle possède une grande cavité pouvant accumuler de grandes quantités de fer (Arosio *et al.*, 2017). Elle joue aussi un rôle important dans l'homéostasie du fer. Elle peut facilement être régulée à la hausse pour produire plus de molécules pour séquestrer le fer dans le cas d'une augmentation de sa biodisponibilité (Aznar *et al.*, 2015). Une quantification du fer a donc été effectuée vu sa relation directe avec la ferritine et en considérant son importance dans les interactions plante-pathogène. Les résultats de cette quantification ont montré effectivement une augmentation significative de la teneur en fer chez les somaclones résistants (Figure 10). Une augmentation de 70 % chez YG8 et de 100 % chez YG32 ont été observées comparés à YGP. On peut suggérer que l'augmentation de la teneur en fer est en relation avec une réponse de défense induite chez les somaclones habitués à la TA. On se base dans cette suggestion sur ce qui a été rapporté dans la littérature concernant le rôle du fer dans les réponses de défense. Il a été démontré que plusieurs gènes impliqués dans l'homéostasie du Fe dans la plante, tels que la ferritine, sont régulés positivement à la suite d'un stress biotique, ce qui suggère que l'infection perturbe l'homéostasie du Fe (Dellagi *et al.*, 2005). Tel que mentionné plus haut, une séquestration du fer par la déféroxamine (DFO) un chélateur de fer exogène a augmenté la résistance chez la pomme de terre contre *Phytophthora infestans* (García Mata *et al.*, 2001). Dans une revue Aznar *et al.* (2015), ont rapporté que l'immunité de la plante pourrait dépendre de l'abondance excessive du fer ou de sa séquestration. Une étude ultérieure de cette équipe a démontré le rôle important de la séquestration du fer dans l'induction du système de défense (Aznar *et al.*, 2014). Ils ont étudié toutes les modifications transcriptionnelles dans les racines et les feuilles des plantes d'*Arabidopsis* traités au DFO. L'immunité et l'homéostasie des métaux sont les principaux processus qui ont été affectés

par la séquestration du fer. Par exemple, les feuilles traitées ont montré une accumulation de l'acide salicylique (SA) et de l'acide jasmonique (JA) significativement supérieure à celle des témoins non traités. De plus, l'expression de gènes de défense et le dépôt de callose en réponse au DFO ont été compromis dans un mutant *irt1* (*iron regulated transporter1*, (Eide *et al.*, 1996; Aznar *et al.*, 2014). Il a aussi été démontré dans l'interaction *Arabidopsis-Erwinia chrysanthemi* que des sidérophores chélateurs de fer peuvent moduler les défenses des plantes par le biais d'un mécanisme antagoniste entre l'acide salicylique et les cascades de signalisation de l'acide jasmonique (Dellagi *et al.*, 2009). Ces études rapportées dans la littérature supportent notre hypothèse concernant l'importance de la ferritine et du fer dans l'induction du système de défense de la plante. Une analyse plus poussée est indispensable pour confirmer cette hypothèse.

Autre que le fer, l'abondance du manganèse a également augmenté chez YG8 et YG32 d'environ 42 et 53 % respectivement par rapport à YGP. Il a été mentionné que le manganèse étant un cofacteur de la superoxyde dismutase (SOD), participe à la défense de la plante contre le stress oxydatif produit par des niveaux élevés de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Il a aussi été suggéré que le Mn pourrait agir en tant que piègeur de superoxyde (O_2^-) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Ducic et Polle, 2005). De plus il semblerait que le manganèse contrôle la biosynthèse de la lignine et de la subérine par l'activation de plusieurs enzymes de l'acide shikimique et des voies des phénylpropanoïdes (Dordas, 2008). Par contre, comme pour la majorité des métaux, un excès en Mn pourrait causer une toxicité à la plante. En plus d'une diminution du taux de croissance cette toxicité pourrait induire une chlorose au niveau des feuilles comme démontré chez le canola (Moroni *et al.*, 2003).

Les somaclones YG8 et YG32 habitués à la TA présentaient aussi respectivement des taux de magnésium supérieurs d'environ 32 et 60 % à ceux du cultivar original. Le rôle du Mg dans l'atténuation des maladies par les pratiques agricoles n'est pas encore déterminé. Par exemple, après un apport supplémentaire en Mg, la gravité des maladies a été réduite pour 22 maladies, augmentée pour 17 maladies et l'effet a été variable pour 6 maladies, en fonction de l'environnement (Moreira *et al.*, 2015). On ne peut pas donc confirmer si les niveaux élevés de magnésium dans nos somaclones ont un effet direct sur la résistance augmentée suite à l'habitation à la TA.

Les somaclones YG8 et YG32 ont montré également une teneur en zinc supérieure à celle du cultivar d'origine d'environ 75 et 82 % respectivement. En tant qu'activateur de Cu / Zn-SOD, le Zn participe ainsi à la protection de la membrane contre les dommages oxydatifs par la détoxification des radicaux superoxydes (Dordas, 2008). De plus, il a été démontré que le Zn était impliqué dans l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes de défense induites par le stress oxydatif, telles que la glutathion réductase et l'ascorbate peroxydase piégeant H₂O₂ (Tsonev et Lidon, 2012). Dans une étude concernant la pourriture de la couronne et de la racine de la tomate causée par *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* (FORL) , il a été démontré que de faibles concentrations de zinc ont aboli la production de l'acide fusarique, une phytotoxine facteur de pathogénicité du FORL, tout en réduisant la biomasse totale du champignon *in vitro* (Duffy and Défago, 1997).

En conclusion, les somaclones résistants à la gale commune ont accumulé dans leurs tubercules d'avantage du fer, du magnésium, du zinc et du manganèse. Cependant, il a été suggéré que les plantes accumulent de fortes concentrations de métaux en tant que mécanisme d'autodéfense contre les agents pathogènes (Poschenrieder *et al.*, 2006). Comme mentionné plus haut, ces métaux sont tous connus pour être impliqués dans les réponses aux stress oxydatif. Une analyse poussée concernant l'activité antioxydante chez ces somaclones pourrait informer plus sur l'implication de cette accumulation de métaux dans l'acquisition de la résistance.

D'autre part, il existe une relation entre la quantité de fer, de ferritine et la teneur en chlorophylle dans les feuilles (Adamski *et al.*, 2012). On sait que la ferritine est un acteur clé de l'homéostasie du fer (Busch *et al.*, 2008). On sait également que l'accumulation de ferritine dans les tabacs transgéniques avait perturbé le système photosynthétique, indiqué par le jaunissement des feuilles, la diminution de la teneur en chlorophylle et la destruction de l'infrastructure chloroplastique. Une preuve supplémentaire de la non-disponibilité du fer dans les tabacs transgéniques surexprimant la ferritine, est leur résistance accrue au méthylviologène, un herbicide dépendant du fer libre (Van Wuytswinkel *et al.*, 2002). Nos résultats corrélaient avec cette théorie vue qu'une diminution significative du niveau de la chlorophylle a été notée dans les feuilles du somaclone YG8 et encore plus importante dans les feuilles du somaclone YG32. Une vérification de l'abondance de la ferritine au niveau

des feuilles pourrait consolider nos résultats. Ceci confirmerait aussi nos résultats de l'analyse protéomique et l'augmentation du taux de la ferritine chez les somaclones YG8 et 32. En perspectives, le rôle du fer dans l'acquisition de la résistance à la gale commune pourrait être une piste prometteuse. La déféroxamine, un agent exogène chélateur du fer pourrait être utilisée pour vérifier l'implication du fer dans la résistance ou la sensibilité de la pomme de terre à la gale commune.

4.1.2.3. Changement au niveau du périderme

Le périderme est le tissu de revêtement du tubercule, c'est la première barrière physique contre les différents stress qui peuvent nuire au développement de la plante. Il a été rapporté que la différence physiologique du périderme des tubercules peut être l'une des raisons de la susceptibilité ou de la résistance de certains cultivars à la gale commune (Tegg *et al.*, 2011). De plus, il a été démontré que la production de la TA par *S. scabies* est induite par la présence de la subérine dans le milieu de culture (Lerat *et al.*, 2010). Pour notre projet, les changements au niveau du périderme ont été évalués chez les somaclones résistants à la gale commune pour vérifier si la résistance acquise est accompagnée par des changements au niveau du périderme. La microscopie à fluorescence a été utilisée dans le but de vérifier les changements au niveau de l'épaisseur et la structure du suber ou phellème (couche externe du périderme). Pour les somaclones YG8 et YG32, une augmentation significative du nombre de couches de cellules subérifiées (cellules mortes du suber) a été notée mais ces cellules ont une forme moins bien définie comparé à ceux du cultivar parent. Ces résultats ont permis de supporter notre hypothèse que la résistance acquise est accompagnée par un changement au niveau du périderme qui confère au tubercule une barrière plus épaisse face à l'agent pathogène. Nos résultats corrélerent avec ce qui a été rapporté dans la littérature, que le périderme est impliqué dans l'acquisition de la résistance du tubercule à la gale commune (Thangavel *et al.*, 2016b). L'équipe de Wilson qui a sélectionné des clones de cals après les avoir mis en contact avec de fortes concentrations de TA (Wilson *et al.*, 2009), a examiné histologiquement les tissus des péridermes des tubercules à partir de clones résistants et de leurs parents susceptibles suivant leur réponse à la toxine et aux agents pathogènes (Thangavel *et al.*, 2016). Cette équipe a trouvé qu'il y a plus de couches cellulaires de phellème, avec accumulation de subérine dans ces tissus. Ils ont aussi démontré que le

nombre de couches du périoderme et l'excès de la subérification des lenticelles des tubercules peut déterminer la résistance de la pomme de terre à la gale commune et la gale poudreuse (Thangavel *et al.*, 2016). Le rôle du dépôt de la subérine comme réponse de défense et aux stress a bien été étudié chez la pomme de terre (Dastmalchi *et al.*, 2015; Lobato *et al.*, 2018; Machinandiaarena *et al.*, 2018; Woolfson *et al.*, 2019) et chez d'autres espèces tels que la tomate (Han *et al.*, 2018a), le riz (Billy, 2016), le radis (Kováč *et al.*, 2018), l'orge (Kreszies *et al.*, 2019) et le kiwi (Han *et al.*, 2018b). La déposition de la subérine comme réponse de défense ou aux stress est une des différentes formes de la résistance structurale de la plante démontrée chez plusieurs espèces. Chez la tomate, la résistance induite par le benzothiadiazole à *Fusarium oxysporum* a été accompagnée par une accumulation massive de barrières structurales (Benhamou et Bélanger, 1998; Cordier *et al.*, 1998). Chez la pomme de terre, il a été démontré que l'induction d'une réponse de défense par des éliciteurs tels que l'acide jasmonique peut induire une intensification de la cicatrisation au niveau du périoderme (Ozeretskovskaya *et al.*, 2009). Ces réactions anatomiques et structurales liées à la mise en place de la défense ont été rapporté aussi chez d'autres espèces parmi lesquelles *Picea abies* (Franceschi *et al.*, 2002), la fraise (Salazar *et al.*, 2007), l'arachide (Shi et Cai, 2008). Les résultats de ce projet consolidés par ce qui a été rapporté dans la littérature laissent suggérer que l'habituation des cals à la TA a induit une activation des voies et réponses aux stress impliquées dans la production de la subérine et de l'épaississement du périoderme.

Une étude plus approfondie du périoderme des somaclones YG8 et YG32 a démontré que ce n'est pas seulement la forme qui a changé au niveau des cellules du périoderme mais aussi la subérine contenue dans ces cellules. Les effets de la subérine extraite des tubercules des somaclones YG8, YG32 et du Parent YGP sur la croissance de *S. scabies* et sur sa production en TA ont été comparés. Une diminution significative de la production de la TA par *S. scabies* a été notée lorsque la subérine rajoutée au milieu a été extraite des tubercules des somaclones YG8 et YG32 comparée à celle extraite des YG parents. Ces résultats permettent de conclure que l'habituation a induit chez les somaclones des changements au niveau de l'épaisseur du phellème qui protège le tubercule contre la pénétration de l'agent pathogène mais aussi des changements au niveau de la subérine qui lui permettent d'agir sur la bactérie en inhibant sa pathogénicité (sa production en TA). Dans ce contexte, il a été rapporté que les composants de la subérine diffèrent considérablement d'une espèce à l'autre et même au niveau des

différents organes de la même espèce (Ferreira *et al.*, 2013). Il a été démontré que chez deux variétés de pomme de terre, la teneur et la composition de la subérine a été différente (Järvinen *et al.*, 2011). Ces différences ont aussi été mises en évidence à différents stades de développement chez une variété de poire comparée à son mutant ayant une peau «Russet» (Heng *et al.*, 2017). Selon Bernards, (2002), les domaines polyaliphatiques et polyaromatiques de la subérine ont des rôles distincts dans le développement de la résistance aux infections. Il est donc possible de suggérer que la subérine dans les tubercules des somaclones a une composition différente de celle des tubercules du cultivar parent d'une manière à agir différemment sur la production en TA de l'agent pathogène. Cette suggestion devrait être étudiée pour mieux comprendre ce qui a changé au niveau des interactions entre la plante et la bactérie. Comme perspectives, une évaluation de la composition de la subérine dans les tubercules des somaclones pourrait être faite. Il va falloir vérifier si un changement au niveau de la composition ou l'organisation des molécules de la subérine aurait causé un changement de son effet sur la bactérie. D'autre part, une analyse comparative du protéome de la bactérie mise en culture en présence de la subérine extraite des tubercules du parent ou des somaclones pourrait guider plus pour comprendre le changement derrière l'inhibition de la production de la TA par *S. scabies*.

4.2. Objectif 2: Habituation d'autres cultivars à la TA et évaluation de leur résistance à la gale commune

Pour augmenter la résistance à la gale commune une méthode a été développée et qui consiste à habituer des cals de pomme de terre à la thaxtomin A produite par *S. scabies*. En utilisant cette méthode, des somaclones de YG plus résistants à la gale commune que le cultivar parent ont pu être régénérés. Étant donné les résultats prometteurs de cette méthode et après avoir confirmé la résistance des somaclones obtenus, cette même méthode a été appliquée à de nouveaux cultivars cultivés ou en cours de développement au Québec. Ces cultivars sont Roselys, Shepody, Campagna et Exp 704.10. Le nombre de régénérants obtenus par cultivar a été variable. Ceci n'est pas surprenant car tous les cultivars ne réagissent pas de la même manière à la culture *in vitro* compte tenu du génotype, de l'état physiologique de la plante, la saison ou de l'environnement optimal de culture (Sarmah *et al.*, 2017). Pour pouvoir régénérer des somaclones à partir de tous les cultivars, beaucoup de

prises au point au niveau du milieu de culture devront être faites. Étant le meilleur qui a répondu à l'habitué, le cultivar Shepody a donné 29 régénérants. Vu le manque de temps et d'espace pour tester tous les régénérants, 5 somaclones parmi 29 ont été choisis. Les paramètres de sélection de ces 5 somaclones sont principalement la taille des boutures, la vitesse de croissance et la vitesse d'enracinement. Ces somaclones ont été testés pour leur résistance à la gale commune par bourgeons foliaires, une méthode qui représentait un moyen rapide de criblage préliminaire vu le nombre élevé de somaclones. Les conditions de culture et d'infection dans cette méthode de bourgeons foliaire sont très différentes de ceux des plantes au champs. Afin de vérifier la fiabilité de cette méthode, les somaclones qui ont montré une résistance à la gale commune avec les bourgeons foliaires ont donc été testés de nouveau par infection en pots. Deux somaclones parmi cinq, Shepody 20 et Shepody 24, ont été significativement plus résistants aux infections par rapport à Shepody Parent. Une augmentation significative du nombre de tubercules ayant 6 % ou moins de surface infectée (le pourcentage maximum accepté sur le marché) chez ces somaclones a été notée qui a passé de 8 % chez Shepody parent à 52 % et 75 % respectivement chez Shepody 20 et 24. Ces résultats confirment que l'habitué à la TA est une méthode efficace pour régénérer des somaclones qui pourraient être résistants à la gale commune à partir de plusieurs cultivars de pomme de terre. Cependant, il reste à confirmer que la résistance est maintenue au fil des années pour les somaclones de Shepody. Tous les changements chez les somaclones pourraient être dus à des variations épigénétiques ou génétiques.

Il existe dans la littérature d'autres exemples où des plantes présentant une meilleure résistance à un agent pathogène ont été isolées par des méthodes de culture *in vitro* et /ou utilisant un agent de sélection issu de l'agent pathogène. Par exemple, des cellules de sept cultivars de pomme de terre ont été sélectionnées *in vitro* avec un filtrat de culture de *Phytophthora infestans*. Les plantes régénérées ont montré une amélioration de certains facteurs de résistance partiels au mildiou par rapport aux plantes sources (Cerato *et al.*, 1993). Dans un autre cas chez la pomme de terre, deux cycles de sélection avec différentes concentrations de filtrat de *V. dahliae* ont permis de sélectionner un clone résistant. Suite à une inoculation par *V. dahliae*, les dommages induits et les traits morphologiques (poids sec, surface foliaire et production de tubercules) ont été évalués. Le clone sélectionné était comparable au contrôle résistant, cv Kondor (Sebastiani *et al.*, 1994). Comme déjà

mentionné, une approche de sélection de cellules somatiques de pomme de terre, développée en utilisant la thaxtamine A en tant qu'agent de sélection, a permis de produire des colonies de cellules du cultivar Iwa à partir duquel des variants régénérés ont montré une résistance significativement plus grande à la gale commune que le cultivar parent non sélectionné (Wilson *et al.*, 2009). La variation somaclonale a été également utilisée pour l'amélioration de traits désirables chez d'autres espèces, tel que le banane (Moradi *et al.*, 2017), la fraise (Karim *et al.*, 2015) et la tomate (Popoola *et al.*, 2015). Par exemple, chez la canne à sucre des variants résistantes aux maladies, aux herbicides, à la sécheresse, au sel et aux antibiotiques ont été isolées par sélection *in vitro* (Manchanda *et al.*, 2018). Les variations somaclonales sont des modifications génétiques ou épigénétiques induites dans des cultures de cellules et de tissus végétaux (Anil *et al.*, 2018). Les résultats publiés antérieurement dans la littérature scientifique ainsi que les résultats de nos expériences suggèrent que ces variations somaclonales induites dans la culture tissulaire est un moyen pour générer une résistance à certaines maladies.

Comme perspectives, les variations phénotypiques pourraient être vérifiées, par la détection morphologique où on peut visuellement détecter les différences entre les cultivars d'origine et les somaclones au niveau de la morphologie, de la pigmentation et de la taille des plantes. Les modifications génétiques et épigénétiques pourraient être analysées à l'aide de marqueurs ISSR et RAPD sensibles à la méthylation (Tiwari *et al.*, 2015). La cytométrie en flux pourrait aussi être un moyen pour vérifier les changements au niveau du nombre de chromosomes (Tiwari *et al.*, 2018). Ces investigations seraient un moyen pour explorer les changements au niveau du génome qui seraient à l'origine de la résistance des somaclones à la gale commune. Une comparaison entre les somaclones résistants des différents cultivars permettrait de comprendre si l'habituation des cals permet d'augmenter la résistance à la gale commune par l'induction de voies similaires chez tous les cultivars ou est-ce que chaque cultivar s'adapte différemment au stress causé par l'habituation.

4.3. Objectif 3: Évaluation de l'effet du traitement foliaire au 2,4-D

4.3.1. Induction de la résistance à la gale commune et à la TA

Le 2,4-D est une auxine synthétique. Il a été rapporté dans la littérature que le traitement foliaire avec cette auxine au début de développement de la pomme de terre diminue la sévérité des symptômes de la gale commune (Tegg *et al.*, 2008). Dans cette partie du projet l'effet du traitement au 2,4-D dans la protection de la pomme de terre à la gale commune a été confirmé. Le traitement foliaire au 2,4-D des plants de pomme de terre, préalablement infectés par *S. scabies*, a diminué la sévérité des symptômes de la gale commune. L'indice de gale commune était significativement plus bas chez les tubercules infectés traités, soit 1,29 comparé à 3,26 chez les tubercules infectés non traités. Le pourcentage moyen de surface infectée a aussi diminué et a passé de 35 % chez les tubercules provenant des plants témoins à 7 % chez les tubercules provenant des plants traités (Figure 17). Ces résultats confirment les travaux antérieurs évoquant l'effet du 2,4-D sur l'incidence de la gale commune de la pomme de terre. Il a été démontré que l'application foliaire de 2,4-D et de 3,5-D réduisait la gale commune de 45 % et 87 % respectivement comparés aux témoins non traités (Tegg *et al.*, 2008). En outre, il a été démontré que l'auxine était définitivement impliquée dans la réponse de la pomme de terre au stress (Kolachevskaya *et al.*, 2019). Après récolte, les tubercules obtenus des plants traités au 2,4-D ont été testés pour leur résistance à la TA. Ces tubercules ont montré des lésions clairement moins sévères que celles présentées par les témoins non traités. Des résultats similaires ont été antérieurement reportés par Tegg *et al.*, (2008) où ils ont démontré que le traitement au 2,4-D réduisait significativement les nécroses induites par la TA sur des tranches de pomme de terre. Il a été alors suggéré que cette réduction des nécroses causés par la TA pourrait être due à une accumulation du 2,4-D au niveau des tubercules suite au traitement. Dans notre laboratoire une diminution de la toxicité de la TA en présence de 2,4-D ou d'IAA (Indole-3-Acetic-Acid) dans le milieu de culture a aussi été mise en évidence chez des cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana* (Awwad, 2018). Le traitement au 2,4-D protège la pomme de terre contre la gale commune et induit une tolérance à la TA au niveau des tubercules. Ces résultats laissent à suggérer que l'accumulation du 2,4-D au niveau des tubercules diminue la toxicité de la TA comme le cas chez les cellules d'*Arabidopsis* (Awwad, 2018). On sait

aussi que le 2,4-D n'a pas d'effet direct sur la bactérie (Tegg *et al.*, 2008). Donc le 2,4-D pourrait agir au niveau du tubercule et le préparer à mieux se défendre contre la TA en cas d'une infection par *S. scabies*.

4.3.2. Analyse protéomique

L'effet du traitement au 2,4-D dans la protection de la pomme de terre contre la gale commune a été confirmé. Ensuite, une analyse protéomique quantitative a été utilisée pour identifier ou cerner les mécanismes impliqués dans cette résistance acquise suite au traitement. La comparaison du profil protéomique a montré que le traitement au 2,4-D induisait l'activation du système de défense de la plante. Plusieurs protéines impliquées dans différentes voies de réponses aux stress et dans la défense sont devenues plus abondantes dans les tubercules après un traitement foliaire au 2,4-D. La lipoxygénase était la protéine la plus abondante dans les tubercules des plantes traitées par rapport aux plantes non traitées. L'expression de la lipoxygénase est régulée par différents effecteurs, tels que l'acide jasmonique et l'acide abscissique, ainsi que par différentes formes de stress, telles que les blessures, la carence en eau ou les attaques d'agents pathogènes (Taj *et al.*, 2011). Dans ce contexte, il a été démontré que l'induction précoce de la lipoxygénase joue un rôle important dans la défense des plantes contre les agents pathogènes (Safaie Farahani et Taghavi, 2016). Il a été démontré aussi que les produits de la Lox jouent un rôle dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques comme des composés antimicrobien et des molécules de signal qui conduisent à l'activation de gènes de défense spécifiques (Göbel *et al.*, 2001). Il a même été affirmé que les niveaux physiologiques de la protéine Lox peuvent être considérés comme un marqueur utile de la résistance à la gale poudreuse dans les programmes d'amélioration de la pomme de terre (Perla *et al.*, 2014). Chez le tabac, la lipoxygénase, s'est avéré nécessaire pour la résistance à *Phytophthora parasitica nicotianae* (Veronesi *et al.*, 1996). Elle joue aussi un rôle important dans la réponse du concombre à la défense contre les agents pathogènes (Göbel *et al.*, 2001; Safaie Farahani et Taghavi, 2016). Des cellules de pomme de terre en culture traitées avec un éliciteur de *Phytophthora infestans*, ont montré une accumulation des transcriptions codant pour une linoléate 9-lipoxygénase et une linoléate 13-lipoxygénase (Göbel *et al.*, 2001). De plus la stimulation de la voie de la Lox chez le haricot par une souche non pathogène de *Pseudomonas* a été associée à une résistance

systémique induite. Cette résistance a permis de diminuer la sensibilité de l'haricot à la moisissure grise causée par *B. cinerea* (Ongena *et al.*, 2007). Ceci est en cohérence avec nos observations qui suggèrent qu'un traitement précoce au 2,4-D aurait entraîné une augmentation de l'abondance de la lipoxigénase qui est probablement accompagnée par l'induction de certaines voies de défense de la plante.

Par ailleurs, une autre protéine était plus abondante dans les tubercules dont les plants ont été traités au 2,4-D, la protéine semblable à la glutathion S-transférase L3. La glutathione S-transférase est une protéine liée aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), connue pour être impliquée dans la réponse de défense (Lim *et al.*, 2013). Cette protéine s'est révélée être plus abondante dans les feuilles de pomme de terre et impliquée dans la résistance à *Phytophthora infestans* induite par un produit chimique exogène (Fongicide à base de phosphite) (Lim *et al.*, 2013). Deux autres protéines liées aux réponses de défense ont été régulées positivement après le traitement au 2,4-D, une protéine semblable à la 8-hydroxygeraniol déshydrogénase et la glutathion S-transférase probable. De même, le gène de type 8-hydroxygeraniol déshydrogénase était l'un des gènes régulés positivement dans les lignées de pomme de terre ayant une résistance plus élevée au mildiou (Sundaresha *et al.*, 2018).

En conclusion, les résultats de l'analyse protéomique ont permis de confirmer que le traitement au 2,4-D active certaines voies du système de défense de la plante, ce qui lui permettrait de mieux répondre ou de réagir plus rapidement aux attaques pathogènes. L'implication de la voie de la lipoxigénase pourrait être importante pour cette résistance induite. Une vérification de cette hypothèse serait intéressante pour mieux comprendre la réponse de défense à la gale commune. Ceci peut se faire en surexprimant le gène de la lipoxigénase ou d'une autre protéine rendue plus abondante après le traitement au 2,4-D chez ces cultivars par transformations génétiques afin de tester l'implication de cette protéine dans la résistance à la gale commune.

Cependant, le 2,4-D est toxique pour l'environnement et pour la santé à forte doses. Comme perspectives, une autre méthode d'élicitation pourrait être utilisée pour activer les mêmes voies induites par le traitement mais d'une manière plus respectueuse de l'environnement. Par exemple, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFCP) sont connues par

leur capacité d'induire des mécanismes de défense des plantes efficaces contre les agents pathogènes. Il a été démontré qu'une élicitation de la tomate par *Pseudomonas putida* BTP1 a induit une résistance systémique impliquant la stimulation de deux isoformes de la lipoxygénase (Mariutto *et al.*, 2011).

4.3.3. Changements au niveau du périderme

Le fait que le traitement au 2,4-D protégeait la pomme de terre contre la gale commune et que cette résistance était accompagnée par des changements au niveau du protéome a été confirmé. Ensuite il a fallu vérifier l'hypothèse qui stipulait que des changements au niveau du périderme pourraient aussi être associés à cette augmentation de la résistance suite au traitement au 2,4-D. L'évaluation du suber (la partie extérieure du périderme constituée de couches de cellules mortes) des tubercules des plants traités et non traités au 2,4-D a montré qu'il y avait effectivement des changements concernant le nombre de couches subérifiées. Moins de couches subérifiées au niveau du périderme des tubercules dont les plants ont été traités au 2,4-D ont été notées. Les cellules de ces couches cellulaires subérifiées avaient une aire moyenne significativement plus grande et une forme significativement moins régulière comparé aux cellules du périderme des tubercules de plants non traités au 2,4-D. En 2008, Tegg *et al.*, ont affirmé qu'aucune différence n'est perceptible dans la morphologie péridermique et lenticulaire entre les tubercules de contrôle et ceux provenant de plantes traitées au 2,4-D (leurs résultats n'ont pas été présentés) (Tegg *et al.*, 2008b). Par contre ils ont noté que le traitement au 2,4-D a occasionnellement eu un effet mineur mais significatif sur les dimensions des lenticelles où la largeur moyenne a été réduite de 10 %. En ce qui concerne l'effet du 2,4-D, ils ont vérifié l'effet direct du 2,4-D dans le milieu de culture des bactéries et ont confirmé que le 2,4-D n'a pas d'effet directe sur le développement de la bactérie ni sa production en TA (Tegg *et al.*, 2008). En contrepartie, la bactérie a été mise en culture en présence de la subérine provenant des tubercules de plants traités au 2,4-D. Celle-ci a poussé beaucoup moins et a produit significativement moins de TA comparé aux bactéries cultivées en présence de subérine de tubercules de plants témoins. La quantité de TA produite a passé de 38 µg/mg de bactéries à 7 µg/mg respectivement en présence de subérine de tubercules de plants traités et en présence de subérine de tubercules de plants non traités (Tableau 14). Les résultats de ce projet comparés à ce qui a été rapporté par Tegg

et al. (2008) permettent de conclure que le traitement au 2,4-D agit plus probablement indirectement en induisant des changements au niveau du périderme puisqu'il n'agit pas directement sur la bactérie. Il est donc probable que le 2,4-D active le système de défense de la plante impliquant des changements au niveau de la formation de la barrière physique du tubercule, le périderme. Le traitement a probablement aussi induit un certain changement au niveau de la composition ou l'organisation de la subérine des tubercules, ce qui expliquerait la réduction de croissance de la bactérie et aussi sa capacité à produire de la TA. Dans une étude antérieure, des changements constitutifs au niveau des tubercules ont été notés suite à une induction de la défense par le phosphonate contre l'agent pathogène. Après une blessure et une infection par *Fusarium solani*, une accumulation plus importante de pectine dans les tissus corticaux a été observée dans les tubercules de plants traités au phosphonate de potassium (Olivieri *et al.*, 2012). Plusieurs études ont démontré qu'une élicitation de la défense constitutive ou induite est un outil pour augmenter la résistance des plantes aux attaques pathogènes. Nos résultats corréleront avec ce qui est rapporté dans la littérature et laissent suggérer que le traitement au 2,4-D active le système de défense de la plante, sur plusieurs plans métaboliques et structurales ce qui lui permet de mieux répondre aux attaques pathogènes.

4.4. Conclusion générale

La culture de tissus végétaux dans des conditions de stress telles que la stérilisation et les blessures, la composition des milieux ou également des conditions environnementales non optimales; peut générer une variabilité génétique, telle que des variations somaclonales résultant d'une mutation génétique ou de changements épigénétiques. À partir de cette évidence, l'hypothèse que l'habituation des cals de pomme de terre à la TA pourrait provoquer de tels variations et générer éventuellement des somaclones résistants à la gale commune a été émise.

Ce projet a permis de confirmer que la méthode de l'habituation des cals permet de régénérer de nouveaux somaclones ayant une résistance à la gale commune plus élevée que les cultivars de départ. Les boutures cultivées *in vitro* de ces somaclones ont gardé leur résistance pour plusieurs années. Cependant ceci ne prouve pas que ces somaclones gardent

leur résistance au fil des générations pour pouvoir les considérer comme de nouveaux cultivars résistants à utiliser en production. Pour pouvoir confirmer que l'habitation des cals à la TA représente une alternative de contrôle pour la gale commune, il faudra tester la résistance de ces somaclones plusieurs fois par multiplication végétative à partir de semences (tubercules) de somaclones. Si d'autres recherches arrivent à confirmer la résistance au fil des générations chez Yukon Gold comme le cas pour Russet Burbank cette méthode pourrait être très intéressante sur le plan pratique et appliqué.

Il a aussi été démontré que la résistance acquise par les somaclones chez le cultivar Yukon Gold est accompagnée par des changements au niveau du protéome, de la teneur en fer, de la teneur en chlorophylle et aussi au niveau du périoderme et de la subérine. Tous ces résultats permettent de suggérer que la résistance à la gale commune implique plusieurs voies de défense. Sur le plan fondamental, ce projet a ouvert de nouvelles pistes pour la recherche concernant la maladie de la gale commune. Par exemple, l'implication du fer et de la ferritine dans la résistance à la gale commune semble être une piste de recherche intéressante à étudier. Toutes les protéines qui sont rendues significativement plus abondantes chez les somaclones pourraient aussi informer sur d'autres voies impliquées dans cette résistance acquise.

En ce qui concerne la deuxième partie de ce projet, il a été confirmé que le 2,4-D protège la pomme de terre contre la gale commune. Les analyses protéomique et histologique ont démontré que le traitement au 2,4-D induit des changements au niveau du protéome et du périoderme. Sur le plan fondamental ces résultats ont permis d'identifier certaines protéines qui pourraient être la clé pour produire des variétés résistantes à la gale commune. Par exemple, la lipoxygénase qui est une protéine d'intérêt pour la défense de la plante. Par contre le 2,4-D n'est pas une solution pratique car il est toxique pour l'environnement. Donc ce projet avait pour but principalement d'identifier les voies de défense induites par le traitement au 2,4-D.

En général, ce projet a permis de conclure que l'habitation à la TA permet de régénérer des somaclones résistants à la maladie mais il reste à confirmer si cette résistance serait maintenue au fil des générations par multiplication végétative. Les changements

protéomiques et histologiques associés à la résistance des somaclones obtenus présentent aussi des nouvelles pistes pour la recherche fondamentale afin de mieux explorer l'interaction entre la pomme de terre et *S. scabies* impliquant le rôle du périoderme et de la subérine et éventuellement de mieux comprendre le mécanisme de la résistance à la gale commune. Le traitement au 2,4-D a permis à son tour d'identifier des protéines qui pourraient être impliquées dans des voies de défense à la gale commune. L'identification de ces voies est fondamentale pour d'ultérieures investigations afin de trouver des alternatives au 2,4-D induisant les mêmes voies mais qui ne sont pas nocives pour l'environnement et la santé humaine.

Annexes

Tableau S.1. Protéines dont l'abondance est augmentée ou diminuée d'un facteur ≥ 2 chez les tubercules du somaclone Yukon Gold 8 comparées au cultivar parent YGP.

Identifiant des protéines	Test de Welch (valeur de p)	YG8 /YGP
Q9SWS0	0,020	11,24
M1AEP8	0,013	10,14
Q3HVN2	0,017	9,69
M1CVV1; A0A097H1F0; M1ASF0	0,045	8,27
Q6H3X8; P93784; M1BC18	0,048	8,02
Q6R2P7; Q38M50; Q2PYW8; Q43643	0,041	6,84
M1B547	0,020	6,81
Q38HU7; Q38JH6; M1C8L6	0,042	6,65
M0ZNB0	0,002	6,60
A8UGP3; M1DBY9	0,038	6,41
M1CHW0; M1CHV8; M1AUG6; M1AUG5	0,049	5,88
Q38M72; M1BIW3; M1A3S2	0,014	5,64
P93786	0,005	5,61
M1CNK1; Q38JI4	0,021	5,57

Identifiants des protéines	Test de Welch (valeur de <i>p</i>)	YG8 /YGP
M1C075; Q2XTE5; Q8LRU7; M1A3V8	0,003	5,28
M1AH14; Q308A9	0,018	4,93
Q9FEN7; M1A028	0,025	4,80
M1A9C1	0,000	4,76
M1AHY9; Q3HRW3	0,019	4,51
M1C6I0	0,035	4,40
Q307Z8; M1C5E6; M1CWA9	0,010	4,22
Q2XPV0; M1BY04	0,046	4,19
M1ALA6	0,002	4,17
Q9LM03; M1CQ02	0,021	4,05
M1AYY7	0,012	4,04
P21342; M1AMC5; M1AMC6	0,021	4,00
M1CN89	0,039	3,82
M1CTR3; O04916	0,032	3,81
M1BWS8; M1AC28; M1AC30; M1AC27	0,002	3,76
M1B5I2; M1B5I1; M1B4K0	0,014	3,70
M1BDU1	0,011	3,64
Q00775; M1AVV0; B0ZTE3; Q1PIB7	0,005	3,59

Identifiants des protéines	Test de Welch (valeur de <i>p</i>)	YG8 /YGP
M1CT47; M1BAM8; Q38JI7	0,041	3,58
M1B0U4	0,003	3,58
M1AWK7	0,011	3,57
M1ACV3; M1CMR9; M1BWL4	0,020	3,53
Q2PYY8; M1BFT7; M1CGF9; M1CGF8	0,041	3,47
M1CTC4; M1CH0	0,043	3,43
M1CNG1	0,033	3,42
M1CGF6	0,020	3,39
M1BBH3	0,012	3,28
Q307Y6; Q2XTC3; P25083	0,026	3,26
M0ZUB7; M0ZUB8	0,006	3,15
M1B9J6; M1B9J5; M1B9F5; M1B9F4	0,010	3,14
P43349; M1CAU2	0,017	3,13
P93785; M1BI71	0,011	3,12
M1AWV2	0,001	3,08
M1AQQ0	0,008	3,06
M0ZWP5	0,040	3,04
M1D2H8	0,023	3,02
M1A3D8	0,033	2,97

Identifiants des protéines	Test de Welch (valeur de <i>p</i>)	YG8 /YGP
M1CWI5	0,031	2,94
M1BUB0	0,044	2,90
Q308A7	0,025	2,83
M1CC25; M1B6Z5	0,006	2,82
M1A0W3; M1AXI1; M1AXJ2	0,013	2,81
M1AYK7	0,022	2,79
M1C547	0,029	2,76
M1CA90	0,046	2,74
M1C6L7; M1AYE1	0,045	2,65
Q8H9D4; M1D1Y8	0,049	2,62
Q84UG9	0,038	2,61
M1B9T8	0,022	2,59
M1CY07; Q2PYW3; M1D357	0,002	2,55
M1BWT8; M1AA72	0,026	2,41
M1CK73; M1CK72	0,008	2,41
K7WNV9	0,003	2,40
Q2XPV4; Q2XTB2	0,048	2,37
M1BCL1; Q38JG4; M1CJB9	0,016	2,36
M1AL00	0,001	2,32

Identifiants des protéines	Test de Welch (valeur de <i>p</i>)	YG8 /YGP
M1BT01	0,001	2,21
Q3HVN5; M1C5D7	0,009	2,19
M1BXI3	0,018	0,47
K7WNY9; M1AT67	0,045	0,43
Q9M3H3; Q2XTE7	0,004	0,42
M1BLX9	0,035	0,41
M1CJ63	0,008	0,40
M1CWN5	0,019	0,37
M0ZRX7; M0ZRX8	0,015	0,33
M1CDF4; Q599K9	0,010	0,33
M1AWS1	0,010	0,33
Q38M77	0,002	0,32
Q3HRZ6; M1BV84	0,014	0,30
M1AAK6	0,030	0,12
Q2MY56	0,008	0,04

Test de Welch, $p \leq 0,05$. Les protéines de trois tubercules différents ont été analysées pour chaque somaclone et pour le parent.

Tableau S.2. Protéines dont l'abondance est augmentée ou diminuée d'un facteur ≥ 2 chez les tubercules du somaclone Yukon Gold 32 comparées au cultivar parent YGP.

Identifiants des protéines	Test de Welch (valeur de p)	YG32 /YGP
Q3HVVQ0; Q3HVK2	0,006	19,02
Q9SWS0; M1CUL2	0,001	19,02
M1AH14; Q308A9	0,000	8,71
Q2V985; M1AED5	0,023	8,70
Q6R2P7; Q38M50	0,014	6,96
M0ZLZ4; A4UV11	0,036	6,63
Q2VCK3; M1CLY0	0,015	6,56
Q38HU7; Q38JH6; M1C8L6	0,024	5,66
P93786	0,030	5,42
M1BU94; M1CDE9	0,014	5,23
P04045; M1ACZ6	0,042	5,21
M1B2L7	0,000	5,02
M1C075; Q2XTE5	0,011	4,87
O04232; Q6ST32; K7X8F1	0,012	4,85
P93787	0,011	4,75
P32811	0,037	4,75
Q307Z8; M1C5E6; M1CWA9	0,010	4,34

Identifiants des protéines	Test de Welch (valeur de p)	YG32 /YGP
Q9LM03; M1CQ02	0,035	4,11
M1AE74; E5LAF9	0,045	3,91
M1A3D8	0,004	3,88
M1B4T5; Q3HRZ3	0,012	3,73
Q2PYY8; M1BFT7	0,031	3,69
P43349; M1CAU2	0,000	3,45
M1DSQ9	0,014	3,30
M1CNK1; Q38JI4	0,026	3,23
M1CTR3; O04916	0,019	3,18
M1ALZ6; M1ALZ7	0,017	3,10
M1A0W3; M1AXI1	0,003	3,07
M1C3G7; M1C3G9	0,001	3,03
M0ZNB0	0,040	2,90
M1AWK7	0,009	2,89
Q2VCJ9; M1BQ50; Q2PYZ0	0,032	2,84
P37831	0,021	2,77
M1CTC4; M1CII0	0,045	2,73
P21342; M1AMC5	0,022	2,69
Q2PXI9; P23509	0,025	2,66

Identifiants des protéines	Test de Welch (valeur de p)	YG32 /YGP
P93785; M1BI71	0,002	2,53
K7WNV9	0,015	2,46
M1BS90; M1BS89	0,028	2,46
Q308A7	0,037	2,46
M1CM59	0,003	2,44
M1BBH3	0,043	2,39
M1CWI5	0,025	2,31
M0ZSD6; Q2VCI5	0,016	2,30
M1ALA6	0,035	2,23
M1A7S5; M1A7S6	0,020	2,11
O04894; M1CPM6	0,011	2,09
Q38M48; M1BTZ0	0,015	0,50
M1AH59	0,020	0,48
Q2VCI8; M1CQ57	0,028	0,44
M1C800	0,036	0,39
M1D6K2; M1D6K3	0,001	0,39
M1AAK6	0,046	0,29
Q9M3H3; Q2XTE7	0,004	0,26
M1CJ63	0,012	0,24

Identifiants des protéines	Test de Welch (valeur de p)	YG32 /YGP
K7WNY9; M1AT67	0,044	0,23
Q2MY56	0,003	0,11
M1CLG1	0,018	0,11
Q3HVK4; Q2VCJ5	0,016	0,09

Test de Welch, $p \leq 0,05$. Les protéines de trois tubercules différents ont été analysées pour chaque somaclone et pour le cultivar parent.

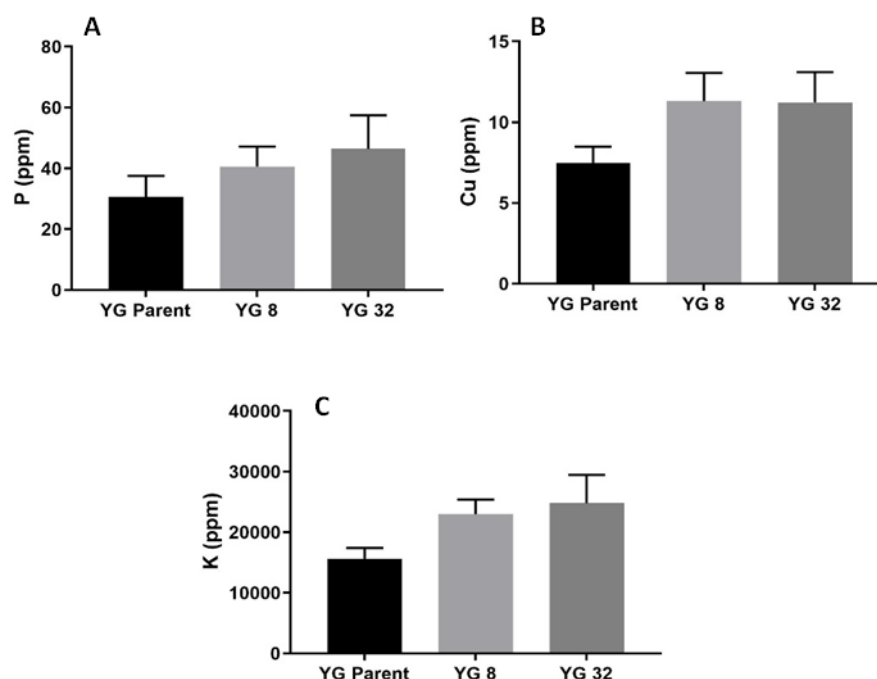


Figure S.1. Quantification du phosphore (A), du cuivre (B) et du potassium (C) par ICP / MS dans neuf tubercules de chaque somaclone YG8 et YG32 ainsi que le cultivar parent YGP (moyenne de trois tests). Les barres d'erreur représentent l'erreur type. *: valeurs significativement différentes par rapport à YGP selon Anova ($p \leq 0,05$). Moyenne des valeurs obtenus pour trois tests.

Bibliographie

- Abd El Rahman, T. (2011). Mécanismes moléculaires contrôlant l'interaction entre *Botrytis Cinerea* et son hôte la tomate. Ph.D thesis, Université de Sherbrooke.
- Adamski, J.M., Danieloski, R., Deuner, S., Braga, E.J.B., de Castro, L.A.S., and Peters, J.A. (2012). Responses to excess iron in sweet potato: impacts on growth, enzyme activities, mineral concentrations, and anatomy. *Acta Physiol Plant* 34, 1827–1836.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* - 5th Edition.
- Alfenas-Zerbini, P., Maia, I.G., Fávaro, R.D., Cascardo, J.C.M., Brommonschenkel, S.H., and Zerbini, F.M. (2009). Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed Genes During the Early Stages of Tomato Infection by a Potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 352–361.
- Andersson, M.S., and Vicente, M.C. de (2010). *Gene Flow Between Crops and Their Wild Relatives* (JHU Press).
- Anil, V.S., Lobo, S., and Bennur, S. (2018). Somaclonal variations for crop improvement: Selection for disease resistant variants in vitro. *Plant Science Today* 5, 44–54.
- Arosio, P., Elia, L., and Poli, M. (2017). Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life* 69, 414–422.
- Awwad, F. (2018). Caractérisation des perturbations pariétales induites par la thaxtamine A chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke.
- Aznar, A., Chen, N.W.G., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaële, D., Mouille, G., Boutet, S., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.-P., et al. (2014). Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores. *Plant Physiology* 164, 2167–2183.
- Aznar, A., Chen, N.W.G., Thomine, S., and Dellagi, A. (2015). Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Science* 240, 90–97.
- Barrette, K. (2017). Étude de la symbiose actinorhizienne chez l'aulne en présence de résidus miniers aurifères acidogènes. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke.
- Basil, A.J., Strap, J.L., Knotek-Smith, H.M., and Crawford, D.L. (2004). Studies on the microbial populations of the rhizosphere of big sagebrush (*Artemisia tridentata*). *J Ind Microbiol Biotechnol* 31, 278–288.

Bauw, G., Nielsen, H.V., Emmersen, J., Nielsen, K.L., Jørgensen, M., and Welinder, K.G. (2006). Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. *The FEBS Journal* 273, 3569–3584.

Bender, C.L., Alarcón-Chaidez, F., and Gross, D.C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 63, 266–292.

Benhamou, N., and Bélanger, R.R. (1998). Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Tomato. *Plant Physiology* 118, 1203–1212.

Bernards, M.A. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany* 80, 227–240.

Bignell, D.R.D., Huguet-Tapia, J.C., Joshi, M. V., Pettis, G.S., and Loria, R. (2010b). What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 98, 179–194.

Billy, C. (2016). Differential cell wall responses to salinity and drought in rice (*oryza sativa* L.). Ph.D. thesis. University of agricultural sciences gkvk, Bengaluru.

Bischoff, V., Cookson, S.J., Wu, S., and Diger Scheible, W.-R. (2009). Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Experimental Botany* 60, 955–965.

Boubakri, H., Saidi, M.N., Barhoumi, F., Kamoun, H., Jebara, M., and Brini, F. (2019). Identification and Characterization of Thioredoxin H-Type Gene Family in *Triticum turgidum* ssp. *durum* in Response to Natural and Environmental Factor-Induced Oxidative Stress. *Plant Mol Biol Rep* 37, 464–476.

Boulet, L. (2007). Colloque sur la pomme de terre. MAPAQ.

Brochu, V., Girard-Martel, M., Duval, I., Lerat, S., Grondin, G., Domingue, O., Beaulieu, C., and Beaudoin, N. (2010). Habituation to thaxtomin A in hybrid poplar cell suspensions provides enhanced and durable resistance to inhibitors of cellulose synthesis. *BMC Plant Biology* 10, 272.

Brown, J.K.M. (2002). Yield penalties of disease resistance in crops. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 339–344.

Busch, A., Rimbault, B., Naumann, B., Rensch, S., and Hippler, M. (2008). Ferritin is required for rapid remodeling of the photosynthetic apparatus and minimizes photo-oxidative stress in response to iron availability in *Chlamydomonas reinhardtii* - Busch - 2008 - *The Plant Journal* - Wiley Online Library.

Canada, A. et A. (2017). Revue d'information sur les marchés de la pomme de terre pour 2015-2016.

- Caraza-Harter, M.V., and Endelman, J.B. (2019). Image-based Phenotyping and Genetic Analysis of Potato Skin Set and Color. *BioRxiv*.
- Cassol, D., De Silva, F.S.P., Falqueto, A.R., and Bacarin, M.A. (2008). An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. *Photosynthetica* 46, 634.
- Cerato, C., Manici, L.M., Borgatti, S., Alicchio, R., Ghedini, R., and Ghinelli, A. (1993). Resistance to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) of potato plants regenerated from *in vitro* selected calli. *Potato Res* 36, 341–351.
- Coll-Martínez, B., and Crosas, B. (2019). How the 26S Proteasome Degrades Ubiquitinated Proteins in the Cell. *Biomolecules* 9, 395.
- Cordier, C., Pozo, M.J., Barea, J.M., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. (1998). Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *MPMI* 11, 1017–1028.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372.
- Darnajoux, R., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., and Bellenger, J.-P. (2015). Determination of elemental baseline using peltigeralean lichens from Northeastern Canada (Québec): Initial data collection for long term monitoring of the impact of global climate change on boreal and subarctic area in Canada - ScienceDirect.
- Dastmalchi, K., Kallash, L., Wang, I., Phan, V.C., Huang, W., Serra, O., and Stark, R.E. (2015). Defensive Armor of Potato Tubers: Nonpolar Metabolite Profiling, Antioxidant Assessment, and Solid-State NMR Compositional Analysis of Suberin-Enriched Wound-Healing Tissues. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6810–6822.
- Davelos, A.L., Kinkel, L.L., and Samac, D.A. (2004). Spatial Variation in Frequency and Intensity of Antibiotic Interactions among Streptomyces from Prairie Soil. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 70, 1051–1058.
- Deák, M., Horváth, G.V., Davletova, S., Török, K., Sass, L., Vass, I., Barna, B., Király, Z., and Dudits, D. (1999). Plants ectopically expressing the ironbinding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* 17, 192–196.
- Dees, M.W., and Wanner, L.A. (2012). In Search of Better Management of Potato Common Scab. *Potato Research* 55, 249–268.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J.-F., Gaymard, F., and Expert, D. (2005). Siderophore-mediated upregulation of Arabidopsis ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal* 43, 262–272.

- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., and Expert, D. (2009). Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *Plant Physiology* 150, 1687–1696.
- Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonnens, A.N., and Golldack, D. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J Exp Bot* 52, 1969–1980.
- Dordas, C. (2008). Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28, 33–46.
- Doumbou, C., Hamby Salove, M., Crawford, D., and Beaulieu, C. (2001). Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l. 82, 85–102.
- Driscoll, J., Coombs, J., Hammerschmidt, R., Kirk, W., Wanner, L., and Douches, D. (2009). Greenhouse and Field Nursery Evaluation for Potato Common Scab Tolerance in a Tetraploid Population. *Am. J. Pot Res* 86, 96.
- Ducharme, A. (2014). Augmentation de la résistance à la gale commune de cultivars de pomme de terre par l’habituatation et la sélection de cellules somatiques.
- Ducic, T., and Polle, A. (2005). Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 103–112.
- Duffy, B.K., and Défago, G. (1997). Zinc Improves Biocontrol of Fusarium Crown and Root Rot of Tomato by *Pseudomonas fluorescens* and Represses the Production of Pathogen Metabolites Inhibitory to Bacterial Antibiotic Biosynthesis. *Phytopathology* 87, 1250–1257.
- Duval, I., and Beaudoin, N. Transcriptional profiling in response to inhibition of cellulose synthesis by thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* suspension cells.
- Duval, I., and Beaudoin, N. (2009). Transcriptional profiling in response to inhibition of cellulose synthesis by thaxtomin A and isoxaben in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Cell Reports* 28, 811–830.
- Duval, I., Brochu, V., Simard, M., Beaulieu, C., and Beaudoin, N. (2005). Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta* 222, 820–831.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., and Guerinot, M.L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *PNAS* 93, 5624–5628.
- Ermolayev, V., Weschke, W., and Manteuffel, R. (2003). Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. - PubMed - NCBI.
- Espinas, N.A., Saze, H., and Saijo, Y. (2016). Epigenetic Control of Defense Signaling and Priming in Plants. *Front. Plant Sci.* 7.

- Faucher, E., Savard, T., and Beaulieu, C. (1992a). Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14, 197–202.
- Faucher, E., Savard, T., and Beaulieu, C. (1992b). Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14, 197–202.
- Ferreira, R., Garcia, H., Sousa, A.F., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Rebelo, L.P.N., and Silva Pereira, C. (2013). Isolation of suberin from birch outer bark and cork using ionic liquids: A new source of macromonomers. *Industrial Crops and Products* 44, 520–527.
- Fogelman, E., Tanami, S., and Ginzberg, I. (2015). Anthocyanin synthesis in native and wound periderms of potato. *Physiologia Plantarum* 153, 616–626.
- Franceschi, V.R., Krekling, T., and Christiansen, E. (2002). Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. *American Journal of Botany* 89, 578–586.
- Franciosini, A., Serino, G., and Deng, X.-W. (2015). Signaling: COP9 Signalosome. In *Molecular Biology*, S.H. Howell, ed. (New York, NY: Springer), pp. 1–17.
- Frescatada-Rosa, M., Robatzek, S., and Kuhn, H. (2015). Should I stay or should I go? Traffic control for plant pattern recognition receptors. *Current Opinion in Plant Biology* 28, 23–29.
- Fu, Z.Q., and Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* 64, 839–863.
- Fry, B.A., and Loria, R. (2002). Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60, 1–8.
- García Mata, C., Lamattina, L., and Cassia, R.O. (2001). Involvement of Iron and Ferritin in the Potato–*Phytophthora infestans* Interaction. *European Journal of Plant Pathology* 107, 557–562.
- Ghobrial, G., Araujo, L., Jinwala, F., Li, S., and Lee, L.Y. (2018). The Structure and Biological Function of CREG. *Front. Cell Dev. Biol.* 6.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M., and Rosahl, S. (2001). Oxylipin Profiling Reveals the Preferential Stimulation of the 9-Lipoxygenase Pathway in Elicitor-treated Potato Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 6267–6273.
- Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. (1998a). Pathogenicity of *Streptomyces scabies* Mutants Altered in Thaxtomin A Production. *Phytopathology* 88, 442–445.
- Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. (1998b). Pathogenicity of *Streptomyces scabies* Mutants Altered in Thaxtomin A Production. *Phytopathology* 88, 442–445.

Goyer, C., Otrysko, B., and Beaulieu, C. (2009). Taxonomie studies on streptomycetes causing potato common scab: a review. *Canadian Journal of Plant Pathology*.

Guo, R., Zhao, J., Wang, X., Guo, C., Li, Z., Wang, Y., and Wang, X. (2015). Constitutive expression of a grape aspartic protease gene in transgenic *Arabidopsis* confers osmotic stress tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult* *121*, 275–287.

Guo, X., Ronhovde, K., Yuan, L., Yao, B., Soundararajan, M.P., Elthon, T., Zhang, C., and Holding, D.R. (2012). Pyrophosphate-Dependent Fructose-6-Phosphate 1-Phosphotransferase Induction and Attenuation of Hsp Gene Expression during Endosperm Modification in Quality Protein Maize. *Plant Physiology* *158*, 917–929.

Gupta, N., Zargar, S.M., Salgotra, R.K., and Dar, T.A. (2019). Identification of drought stress-responsive proteins in common bean. *J Proteins Proteom* *10*, 45–53. Han, X., Mao, L., Lu, W., Tao, X., Wei, X., and Luo, Z. (2018a). Absciscic acid induces differential expression of genes involved in wound-induced suberization in postharvest tomato fruit. *Journal of Integrative Agriculture* *17*, 2670–2682.

Han, X., Lu, W., Wei, X., Li, L., Mao, L., and Zhao, Y. (2018b). Proteomics analysis to understand the ABA stimulation of wound suberization in kiwifruit. *Journal of Proteomics* *173*, 42–51.

Hawkes, J.G. (1990). The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, UK.

Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., and Loria, R. (2000). The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology* *38*, 794–804.

Heng, W., Huang, H., Li, F., Hou, Z., and Zhu, L. (2017). Comparative analysis of the structure, suberin and wax composition and key gene expression in the epidermis of ‘Dangshansuli’ pear and its russet mutant. *Acta Physiol Plant* *39*, 150.

Hill, J., and Lazarovits, G. (2005). A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* *27*, 46–52.

Hilton, A.J., Walker, R.L., and Wale, S.J. (2006). Control of common scab without the use of water. In *Aspects of Applied Biology 79, What Will Organic Farming Deliver?* COR 2006, C. Atkinson, B. Ball, D.H.K. Davies, R. Rees, G. Russell, E.A. Stockdale, C.A. Watson, R. Walker, and D. Younie, eds. (Association of Applied Biologists), pp. 207–210.

Hiltunen, L.H., Alanen, M., Laakso, I., Kangas, A., Virtanen, E., and Valkonen, J.P.T. (2011). Elimination of common scab sensitive progeny from a potato breeding population using thaxtomin A as a selective agent. *Plant Pathology* *60*, 426–435.

- Järvinen, R., Rauhala, H., Holopainen, U., and Kallio, H. (2011). Differences in suberin content and composition between two varieties of potatoes (*Solanum tuberosum*) and effect of post-harvest storage to the composition. *LWT - Food Science and Technology* *44*, 1355–1361.
- Jayasree, T., Pavan, U., Ramesh, M., Rao, A. V., Jagan, K., Reddy, M., and Sadanandam, A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* *64*, 13–17.
- JayaSree, T., Pavan, U., Ramesh, M., Rao, A.V., Jagan Mohan Reddy, K., and Sadanandam, A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* *64*, 13–17.
- Jean, C., and Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (2002). *Maladies, insectes nuisibles et utiles de la pomme de terre* (Québec, QInstitut de recherche et de développement en agroenvironnement).
- Johnson, E.G., Joshi, M. V., Gibson, D.M., and Loria, R. (2007). Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* *71*, 18–25.
- Kachroo, A., and Kachroo, P. (2009). Fatty Acid-derived signals in plant defense. *Annu Rev Phytopathol* *47*, 153–176.
- Karim, R., Ahmed, F., Krishna Roy, U., Ara, T., Islam, R., and Hossain, M. (2015). Varietal Improvement of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Dutch.) Through Somaclonal Variation Using In Vitro Techniques. *Journal of Agricultural Science and Technology* *17*, 977–986.
- Kers, J.A., Wach, M.J., Krasnoff, S.B., Widom, J., Cameron, K.D., Bukhalid, R.A., Gibson, D.M., Crane, B.R., and Loria, R. (2004). Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* *429*, 79–82.
- King, R.R., Lawrence, C.H., Clark, M.C., and Calhoun, L.A. (1989). Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 849.
- King, R.R., Lawrence, C.H., and Clark, M.C. (1991). Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *American Potato Journal* *68*, 675–680.
- King, R.R., Lawrence, C.H., and Gray, J.A. (2001). Herbicidal Properties of the Thaxtomin Group of Phytotoxins. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 2298–2301.
- King, R.R., Harold Lawrence, C., Embleton, J., and Calhoun, L.A. (2003). More chemistry of the thaxtomin phytotoxins. *Phytochemistry* *64*, 1091–1096.
- Kinkel, L.L., Bowers, J.H., Shimizu, K., Neeno-Eckwall, E.C., and Schottel, J.L. (1998). Quantitative relationships among thaxtomin A production, potato scab severity, and fatty acid composition in *Streptomyces*. *Canadian Journal of Microbiology* *44*, 768–776.

- Kolachevskaya, O.O., Lomin, S.N., Arkhipov, D.V., and Romanov, G.A. (2019). Auxins in potato: molecular aspects and emerging roles in tuber formation and stress resistance. *Plant Cell Rep* 38, 681–698.
- Kolattukudy, P.E. (1984). Biochemistry and function of cutin and suberin. *Canadian Journal of Botany* 62, 2918–2933.
- Kolattukudy, P.E., and Agrawal, V.P. (1974). Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin). *Lipids* 9, 682–691.
- Kováč, J., Lux, A., and Vaculík, M. (2018). Formation of a subero-lignified apical deposit in root tip of radish (*Raphanus sativus*) as a response to copper stress. *Ann Bot* 122, 823–831.
- Kreszies, T., Shellakkutti, N., Osthoff, A., Yu, P., Baldauf, J.A., Zeisler-Diehl, V.V., Ranathunge, K., Hochholdinger, F., and Schreiber, L. (2019). Osmotic stress enhances suberization of apoplastic barriers in barley seminal roots: analysis of chemical, transcriptomic and physiological responses. *New Phytologist* 221, 180–194.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., and Sadh, R.K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6, 54.
- Kushalappa, A.C., Yogendra, K.N., and Karre, S. (2016). Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* 35, 38–55.
- Lambert, D.H., and LORIA, R. (1989). *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev.†. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39, 387–392.
- Lambert, D.H., Powelson, M.L., and Stevenson, W.R. (2005). Nutritional interactions influencing diseases of potato. *Am. J. Pot Res* 82, 309–319.
- Lauzier, A. (2007). Facteurs physiologiques modulant la production de thaxtamine chez *S. scabis*. Thèse de doctorat, université de Sherbrooke.
- Lerat, S., Simao-Beaunoir, A.-M., and Beaulieu, C. (2009a). Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 10, 579–585.
- Lerat, S., Babana, A.H., El Oirdi, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Beaudoin, N., Bouarab, K., and Beaulieu, C. (2009b). *Streptomyces scabiei* and its toxin thaxtomin A induce scopoletin biosynthesis in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 28, 1895–1903.
- Lerat, S., Simao-Beaunoir, A.-M., Wu, R., Beaudoin, N., and Beaulieu, C. (2010). Involvement of the Plant Polymer Suberin and the Disaccharide Cellobiose in Triggering Thaxtomin A Biosynthesis, a Phytotoxin Produced by the Pathogenic Agent *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 100, 91–96.

- Lim, S., Borza, T., Peters, R.D., Coffin, R.H., Al-Mughrabi, K.I., Pinto, D.M., and Wang-Pruski, G. (2013). Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. *Journal of Proteomics* 93, 207–223.
- Lim, G.-H., Singhal, R., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2017). Fatty Acid– and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* 55, 505–536.
- Lobato, M.C., Daleo, G.R., Andreu, A.B., and Olivieri, F.P. (2018). Cell Wall Reinforcement in the Potato Tuber Periderm After Crop Treatment with Potassium Phosphite. *Potato Res.* 61, 19–29.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., and Kahmann, R. (2015). Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* 66, 513–545.
- Loria, R., Coombs, J., Yoshida, M., Kers, J., and Bukhalid, R. (2003). A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 65–72.
- Loria, R., Bignell, D.R.D., Moll, S., Huguet-Tapia, J.C., Joshi, M. V, Johnson, E.G., Seipke, R.F., and Gibson, D.M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 94, 3–10.
- Lozano-Durán, R., and Robatzek, S. (2015). 14-3-3 Proteins in Plant-Pathogen Interactions. *MPMI* 28, 511–518.
- Łukaszewicz, M., Matysiak-Kata, I., Aksamit, A., Oszmiański, J., and Szopa, J. (2002). 14-3-3 Protein regulation of the antioxidant capacity of transgenic potato tubers. *Plant Science* 163, 125–130.
- Lulai, E. (2001). The Importance of Phellogen Cells and their Structural Characteristics in Susceptibility and Resistance to Excoriation in Immature and Mature Potato Tuber (*Solanum tuberosum* L.) Periderm. *Annals of Botany* 88, 555–561.
- Luo, S., and Levine, R.L. (2008). Methionine in proteins defends against oxidative stress. *The FASEB Journal* 23, 464–472.
- Machinandiarena, M.F., Oyarburo, N.S., Daleo, G.R., Andreu, A.B., and Olivieri, F.P. (2018). The reinforcement of potato cell wall as part of the phosphite-induced tolerance to UV-B radiation. *Biol Plant* 62, 388–394.
- Manchanda, P., Kaur, A., and Gosal, S.S. (2018). Somaclonal Variation for Sugarcane Improvement. In *Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 1: Cellular Approaches*, S.S. Gosal, and S.H. Wani, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 299–326.
- Mariutto, M., Duby, F., Adam, A., Bureau, C., Fauconnier, M.-L., Ongena, M., Thonart, P., and Dommes, J. (2011). The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC Plant Biology* 11, 29.

Mohan Kumar, G.N., Iyer, S., and Knowles, R. (2007). Extraction of RNA from Fresh, Frozen, and Lyophilized Tuber and Root Tissues | *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5, 1674-1678.

Moradi, Z., Farahani, F., Sheidai, M., and Satari, T.N. (2017). Somaclonal variation in banana (*Musa acuminate* colla cv. Valery) regenerated plantlets from somatic embryogenesis: histological and cytogenetic approaches. *Caryologia* 70, 1–6.

Moreira, W.R., Bispo, W.M. da S., Rios, J.A., Debona, D., Nascimento, C.W.A., and Rodrigues, F.Á. (2015). Magnesium-induced alterations in the photosynthetic performance and resistance of rice plants infected with *Bipolaris oryzae*. *Scientia Agricola* 72, 328–333.

Moroni, J.S., Scott, B.J., and Wratten, N. (2003). Differential tolerance of high manganese among rapeseed genotypes. *Plant and Soil* 253, 507–519.

Nejat, N., and Mantri, N. (2017). Plant Immune System: Crosstalk Between Responses to Biotic and Abiotic Stresses the Missing Link in Understanding Plant Defence. *Current Issues in Molecular Biology* 1–16.

Niczuj, M., Champagne, A., Alam, I., Nader, J., and Boutry, M. (2016). Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells results in cell expansion. *Planta* 244, 1109–1124.

Nishizawa-Yokoi, A., Tainaka, H., Yoshida, E., Tamoi, M., Yabuta, Y., and Shigeoka, S. (2010). The 26S Proteasome Function and Hsp90 Activity Involved in the Regulation of HsfA2 Expression in Response to Oxidative Stress. *Plant Cell Physiol* 51, 486–496. Oh, C.-S. (2010). Characteristics of 14-3-3 Proteins and Their Role in Plant Immunity. *The Plant Pathology Journal* 26, 1–7.

Oh, C.-S., Pedley, K.F., and Martin, G.B. (2010). Tomato 14-3-3 Protein 7 Positively Regulates Immunity-Associated Programmed Cell Death by Enhancing Protein Abundance and Signaling Ability of MAPKKK α . *The Plant Cell* 22, 260–272.

Oliver, R.P., and Solomon, P.S. (2010). New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 415–419.

Olivieri, F.P., Feldman, M.L., Machinandiarena, M.F., Lobato, M.C., Caldiz, D.O., Daleo, G.R., and Andreu, A.B. (2012). Phosphite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm and cortex that enhance resistance to pathogens. *Crop Protection* 32, 1–6.

Ongena, M., Duby, F., Rossignol, F., Fauconnier, M.-L., Dommes, J., and Thonart, P. (2007). Stimulation of the Lipxygenase Pathway Is Associated with Systemic Resistance Induced in Bean by a Nonpathogenic *Pseudomonas* Strain. *MPMI* 17, 1009–1018.

Organisation des Nation Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (2008). Année internationale de la pomme de terre. Disponible [En ligne]: <http://www.potato2008.org/fr/pommedeterre/index.html> Consulté [22 septembre 2010].

Ozeretskoykaya, O.L., Vasyukova, N.I., Chalenko, G.I., Gerasimova, N.G., Revina, T.A., and Valueva, T.A. (2009). Wound healing and induced resistance in potato tubers. *Appl Biochem Microbiol* 45, 199–203.

Pavlista, A.D. (2005). Early-Season Applications of Sulfur Fertilizers Increase Potato Yield and Reduce Tuber Defects. *Agronomy Journal* 97, 599.

Perla, V., Jayanty, S.S., Holm, D.G., and Davidson, R.D. (2014). Relationship Between Tuber Storage Proteins and Tuber Powdery Scab Resistance in Potato. *Am. J. Potato Res.* 91, 233–245.

Popoola, A.R., Durosomo, A.H., Afolabi, C.G., and Idehen, E.O. (2015). Regeneration of Somaclonal Variants of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) for Resistance to Fusarium Wilt. *Journal of Crop Improvement* 29, 636–649.

Poschenrieder, C., Tolrà, R., and Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends in Plant Science* 11, 288–295.

Rai, M.K., Kalia, R.K., Singh, R., Gangola, M.P., and Dhawan, A.K. (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection—An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71, 89–98.

Roberts, M.R., Salinas, J., and Collinge, D.B. (2002). 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Mol Biol* 50, 1031–1039.

Sabba, R.P. (2002). Histological Analysis of the Maturation of Native and Wound Periderm in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tuber. *Annals of Botany* 90, 1–10.

Sable, A., Rai, K.M., Choudhary, A., Yadav, V.K., Agarwal, S.K., and Sawant, S.V. (2018). Inhibition of Heat Shock proteins HSP90 and HSP70 induce oxidative stress, suppressing cotton fiber development. *Sci Rep* 8, 1–17.

Safaie Farahani, A., and Taghavi, S.M. (2016). Profiling expression of lipoxygenase in cucumber during compatible and incompatible plant-pathogen interactions. *Physiol Mol Biol Plants* 22, 175–177.

Salazar, S.M., Castagnaro, A.P., Arias, M.E., Chalfoun, N., Tonello, U., and Díaz Ricci, J.C. (2007). Induction of a defense response in strawberry mediated by an avirulent strain of *Colletotrichum*. *Eur J Plant Pathol* 117, 109–122.

Sarmah, D., Sutradhar, M., and Kumar Singh, S. (2017). Somaclonal Variation and its' Application in Ornamentals Plants. *Int. J. Pure App. Biosci.* 5, 396–406.

Savadi, S., Prasad, P., Bhardwaj, S.C., Kashyap, P.L., Gangwar, O.P., Khan, H., and Kumar, S. (2018). Temporal Transcriptional Changes in SAR and Sugar Transport-Related Genes During Wheat and Leaf Rust Pathogen Interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 37, 826–839.

Scheible, W.-R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., Loria, R., and Somerville, C.R. (2003a). An Arabidopsis Mutant Resistant to Thaxtomin A, a Cellulose Synthesis Inhibitor from Streptomyces Species. *The Plant Cell* 15, 1781–1794.

Scheible, W.-R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., Loria, R., and Somerville, C.R. (2003b). An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from Streptomyces species. *The Plant Cell* 15, 1781–1794.

Schreiber, L., Franke, R., and Hartmann, K. (2005). Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpiration. *Planta* 220, 520–530.

Sebastiani, L., Lenzi, A., Pugliesi, C., and Fambrini, M. (1994). Somaclonal variation for resistance to *Verticillium dahliae* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated from callus. *Euphytica* 80, 5–11.

Semane, B., Dupae, J., Cuypers, A., Noben, J.-P., Tuomainen, M., Tervahauta, A., Kärenlampi, S., Van Belleghem, F., Smeets, K., and Vangronsveld, J. (2010). Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* 167, 247–254.

Sharma, S., Mustafiz, A., Singla-Pareek, S.L., Srivastava, P.S., and Sopory, S.K. (2012). Characterization of stress and methylglyoxal inducible triose phosphate isomerase (OscTPI) from rice. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1337–1345.

Shi, G.R., and Cai, Q.S. (2008). Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to cadmium stress. *Photosynthetica* 46, 627–630.

Singhai, P.K., Sarma, B.K., and Srivastava, J.S. (2011). Phenolic acid content in potato peel determines natural infection of common scab caused by *Streptomyces* spp. *World J Microbiol Biotechnol* 27, 1559–1567.

Song, X.S., Hu, W.H., Mao, W.H., Ogwen, J.O., Zhou, Y.H., and Yu, J.Q. (2005). Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 1082–1088.

Spann, T.M., and Schumann, A.W. (2009). The Role of Plant Nutrients in Disease Development with Emphasis on Citrus and Huanglongbing. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 122, 169–171.

Spoel, S.H., and Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 89–100.

Spooner, D.M., and Knapp, S. (2013). *Solanum stipuloideum* Rusby, the Correct Name for *Solanum circaefolium* Bitter. *Am. J. Potato Res.* 90, 301–305.

Sturz, A.V., Ryan, D.A.J., Coffin, A.D., Matheson, B.G., Arsenault, W.J., Kimpinski, J., and Christie, B.R. (2004). Stimulating disease suppression in soils: sulphate fertilizers can

increase biodiversity and antibiosis ability of root zone bacteria against *Streptomyces scabies*. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 343–352.

Sundaresha, S., Sharma, S., Shandil, R.K., Sharma, S., Thakur, V., Bhardwaj, V., Kaushik, S.K., Singh, B.P., and Chakrabarti, S.K. (2018). An insight into the downstream analysis of RB gene in F1 RB potato lines imparting field resistance to late blight. *Functional Plant Biology* 45, 1026.

Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., and Kumar, A. (2011). Co-expression and in-silico interaction studies for inter-linking the activation of MAPK3 and LOX genes during pathogenesis of *Alternaria brassicae* in *Brassica juncea*. *Journal of Oilseed Brassica* 2, 13–20.

Tateno, M., Brabham, C., and DeBolt, S. (2016). Cellulose biosynthesis inhibitors -- a multifunctional toolbox. *Journal of Experimental Botany* 67, 533–542.

Tegg, R.S., and Wilson, C.R. (2010). Relationship of resistance to common scab disease and tolerance to thaxtomin A toxicity within potato cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 128, 143–148.

Tegg, R.S., Melian, L., Wilson, C.R., and Shabala, S. (2005). Plant cell growth and ion flux responses to the streptomycete phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. *Plant Cell Physiol.* 46, 638–648.

Tegg, R.S., Gill, W.M., Thompson, H.K., Davies, N.W., Ross, J.J., and Wilson, C.R. (2008). Auxin-Induced Resistance to Common Scab Disease of Potato Linked to Inhibition of Thaxtomin A Toxicity. *Plant Disease* 92, 1321–1328.

Tegg, R.S., Corkrey, R., and Wilson, C.R. (2011). Relationship Between the Application of Foliar Chemicals to Reduce Common Scab Disease of Potato and Correlation with Thaxtomin A Toxicity. *Plant Disease* 96, 97–103.

Terol, J., Soler, G., Talon, M., and Cercos, M. (2010). The aconitate hydratase family from Citrus. *BMC Plant Biology* 10, 222.

Thangavel, T., Tegg, R.S., and Wilson, C.R. (2016). Toughing It Out—Disease-Resistant Potato Mutants Have Enhanced Tuber Skin Defenses. *Phytopathology* 106, 474–483.

Thaxter, R. (1892). Potato Scab. Connecticut Agricultural Experimental Station Report 1890, 81-95.

Thompson, H. (2013). Optimisation of 2,4-D treatments for the control of common scab of potato (and related studies). Ph.D. Thesis, University of Tasmania.

Thompson, H.K., Tegg, R.S., Davies, N.W., Ross, J.J., and Wilson, C.R. (2013). Determination of optimal timing of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid foliar applications for common scab control in potato. *Annals of Applied Biology* 163, 242–256.

- Tiwari, J.K., Saurabh, S., Chandel, P., Singh, B.P., and Bhardwaj, V. (2015). Assessment of genetic and epigenetic variations in potato somatic hybrids by Methylation-sensitive ISSR and RAPD markers. *1 44*, 45–50.
- Tiwari, J.K., Devi, S., Ali, N., Luthra, S.K., Kumar, V., Bhardwaj, V., Singh, R.K., Rawat, S., and Chakrabarti, S.K. (2018). Progress in somatic hybridization research in potato during the past 40 years. *Plant Cell Tiss Organ Cult 132*, 225–238.
- Tocho, E., Ricci, M., Tacaliti, M.S., Giménez, D.O., Acevedo, A., Lohwasser, U., Börner, A., and Castro, A.M. (2012). Mapping resistance genes conferring tolerance to RWA (*Diuraphis noxia*) in barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica 188*, 239–251.
- Tsonev, T., and Lidon, F.J.C. (2012). Zinc in plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture 24*, 322–333.
- Tyner, D.N., Hocart, M.J., Lennard, J.H., and Graham, D.C. (1997). Periderm and lenticel characterization in relation to potato cultivar, soil moisture and tuber maturity. *Potato Research 40*, 181–190.
- Van Wuytswinkel, O., Vansuyt, G., Grignon, N., Fourcroy, P., and Briat, J. (2002). Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin - Van Wuytswinkel - 1999 - *The Plant Journal 17*, 93–7.
- Vansuyt, G., Souche, G., Straczek, A., Briat, J.-F., and Jaillard, B. (2003). Flux of protons released by wild type and ferritin over-expressor tobacco plants : effect of phosphorus and iron nutrition. *Plant Physiology and Biochemistry 41*, 27–33.
- Veronesi, C., Rickauer, M., Fournier, J., Pouenat, M.L., and Esquerre-Tugaye, M.T. (1996). Lipoxygenase Gene Expression in the Tobacco-*Phytophthora parasitica nicotianae* Interaction. *Plant Physiology 112*, 997–1004.
- Vincent, D., Ergül, A., Bohlman, M.C., Tattersall, E.A.R., Tillett, R.L., Wheatley, M.D., Woolsey, R., Quilici, D.R., Joets, J., Schlauch, K., et al. (2007). Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *Journal of Experimental Botany 58*, 1873–1892.
- Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, C., Govers, F., Taylor, M.A., MacKerron, D.K.L., and Ross, H.A. (2011). *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Dick Vreugdenhil, Amsterdam, The Netherlands.
- Wang, G., Kong, J., Cui, D., Zhao, H., Niu, Y., Xu, M., Jiang, G., Zhao, Y., and Wang, W. (2019). Resistance against *Ralstonia solanacearum* in tomato depends on the methionine cycle and the γ -aminobutyric acid metabolic pathway. *The Plant Journal 97*, 1032–1047.
- Wang, S., Tao, Y., Zhou, Y., Niu, J., Shu, Y., Yu, X., Liu, S., Chen, M., Gu, W., and Ma, H. (2017). Translationally controlled tumor protein GmTCTP interacts with GmCDPKSK5 in response to high temperature and humidity stress during soybean seed development. *Plant Growth Regul 82*, 187–200.

Wanner, L.A. (2009). A Patchwork of *Streptomyces* Species Isolated from Potato Common Scab Lesions in North America. *American Journal of Potato Research* 86, 247–264.

Weckx, S., Inzé, D., and Maene, L. (2019). Tissue Culture of Oil Palm: Finding the Balance Between Mass Propagation and Somaclonal Variation. *Front. Plant Sci.* 10, 722.

Wilson, C.R., Luckman, G.A., Tegg, R.S., Yuan, Z.Q., Wilson, A.J., Eyles, A., and Conner, A.J. (2009). Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A. *Plant Pathology* 58, 137–144.

Woolfson, K.N., Haggitt, M.L., Zhang, Y., Kachura, A., Bjelica, A., Rincon, M.A.R., Kaberi, K.M., and Bernards, M.A. (2019). Differential induction of polar and non-polar metabolism during wound-induced suberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *The Plant Journal* 93, 931–942.

Yan, L., Fei, K., Bridge, D., and Sarraz Jr., M.P. (2000). A cnidarian homologue of translationally controlled tumor protein (P23/TCTP). *Dev Gene Evol* 210, 507–511.

Yang, X., Wang, W., Coleman, M., Orgil, U., Feng, J., Ma, X., Ferl, R., Turner, J.G., and Xiao, S. (2009). Arabidopsis 14-3-3 lambda is a positive regulator of RPW8-mediated disease resistance. *The Plant Journal* 60, 539–550.

Zhang, Y., Loria, R., and Ding, Y. (2015). Applications of Natural Products from Soil Microbes. Soil Ecosystems Services. Soil Science Society of America, Inc. USA.

Zhao, Y. (2012). Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant* 5, 334–33

